



REC'D 28 DEC 2004

WIPO PCT

# BREVET D'INVENTION

**CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION**

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 21 OCT. 2004

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

**DOCUMENT DE PRIORITÉ**

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)

**BEST AVAILABLE COPY**

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

**SIEGE**

26 bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr



26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 540 0 11 / 210502

<b>REMISE DES PIÈCES</b> DATE <b>23 OCT 2003</b> LIEU <b>75 INPI PARIS</b> N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI <b>23 OCT. 2003</b>		<b>0312390</b>	
<b>Vos références pour ce dossier</b> (facultatif) VCstsF1578/3FR		<b>1</b> NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE  CABINET ORES 36 rue de Saint Petersbourg 75001 PARIS	
<b>Confirmation d'un dépôt par télécopie</b>		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
<b>2 NATURE DE LA DEMANDE</b>		<b>Cochez l'une des 4 cases suivantes</b>	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N° _____ Date _____	
ou demande de certificat d'utilité initiale		N° _____ Date _____	
Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i>		<input type="checkbox"/> N° _____ Date _____	
<b>3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)</b> NOUVEAUX TENSIO-ACTIFS ET LEURS APPLICATIONS			
<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
<b>5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)</b>		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale		TS PHARMA	
Prénoms			
Forme juridique		SARL unipersonnelle	
N° SIREN		_____	
Code APE-NAF		_____	
Domicile ou siège	Rue	830 chemin de Vergon	
	Code postal et ville	13510 EGUILLES	
	Pays	FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)		N° de télécopie (facultatif)	
Adresse électronique (facultatif)			
<input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»			

Remplir impérativement la 2<sup>ème</sup> page

REMISE DES PIÈCES  
DATE **75 INPI PARIS**  
LIEU  
**0312390**  
N° D'ENREGISTREMENT  
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DB 540 W / 210502

<b>6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)</b>			
Nom		ORES	
Prénom		Béatrice	
Cabinet ou Société		CABINET ORES	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel			
Adresse	Rue	36 rue de Saint Petersburg	
	Code postal et ville	75 008 PARIS	
	Pays	FRANCE	
N° de téléphone (facultatif)		01.53.21.11.00	
N° de télécopie (facultatif)		01.53.21.08.88	
Adresse électronique (facultatif)		ores@cabinet-ores.com	
<b>7 INVENTEUR (S)</b>		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques	
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)	
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
<b>10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS</b>		<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences	
Le support électronique de données est joint		<input type="checkbox"/>	
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input type="checkbox"/>	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
<b>11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire) ORES Béatrice 92-4046		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI  M. ROCHET	

La présente invention a pour objet de nouveaux tensioactifs, leur utilisation pour la préparation de systèmes supramoléculaires métastables, ou liposomes, de forme allongée. L'invention a également pour objet les liposomes obtenus à partir de ces tensio-actifs et leur utilisation comme vecteurs de principes actifs, notamment de principes  
5 actifs thérapeutiques.

Certaines molécules amphiphiles, les phospholipides naturels, ont la propriété de s'associer dans l'eau en formant des organisations supramoléculaires métastables de formes sphériques appelées liposomes qui renferment un compartiment aqueux interne. Ces liposomes sont capables de renfermer des actifs thérapeutiques au sein  
10 de ce compartiment interne et peuvent ainsi servir à véhiculer ces actifs vers des cellules ou des tissus cibles. L'étude de ces vecteurs particuliers a fait l'objet d'une littérature abondante dans laquelle les problèmes ainsi que les potentialités de leur utilisation ont été largement abordés (Barenholz, Curr. Opin. In Coll. and Int. Sci. 6 (2001) 66-77).

Toutefois, l'utilisation des liposomes pour le transport de principes actifs  
15 thérapeutiques présente quelques inconvénients majeurs :

Ces nanostructures ont généralement une stabilité relativement faible dans le temps, car dans le milieu dans lequel elles sont dispersées, elles fusionnent pour former des objets plus larges qui précipitent ensuite rapidement. Ce comportement limite fortement leur capacité de conservation et de stockage.

La stabilité biologique de ces vecteurs, c'est-à-dire leur temps de  
20 rétention dans la circulation sanguine, est étroitement associée à leur taille qui doit être inférieure à 200 nm pour leur permettre d'atteindre une cible potentielle (Nagayasu et al., Adv. Drug Del. Rev. 40 (1999) 75-87). Toutefois, les candidats les plus efficaces de ce point de vue : les liposomes uni lamellaires de petites tailles, présentent l'inconvénient  
25 d'être dotés d'un rapport médicament encapsulé / lipides plus faible que les liposomes uni lamellaires de grandes tailles (Vemuri et al., Pharm. Acta Helv. 70 (1995) 95-111). Les lipides formant ces nanostructures présentent généralement un coût de production élevé. La faible capacité d'encapsulation de principes actifs de certains de ces liposomes représente alors un problème économique.

En effet, la formulation du support pharmaceutique ne doit pas dépasser  
30 de manière exagérée le prix de l'actif véhiculé si l'on veut permettre l'utilisation de tels vecteurs dans des formulations à usage thérapeutique.

Enfin, il est indispensable de pouvoir disposer d'un vecteur qui puisse libérer son contenu de manière progressive et continue. De telles propriétés nécessitent  
35 d'avoir recours à des membranes hautement organisées et imperméables qui sont constituées de formulations de lipides complexes et coûteuses.

Malgré ces difficultés un certain nombre de préparations pharmaceutiques à base de liposomes sont disponibles actuellement sur le marché ou sont

en phase clinique. L'avantage le plus appréciable de ces préparations est leur excellente tolérance par rapport à l'utilisation d'un principe actif libre. Leur efficacité à dose équivalente est cependant à peine supérieure. C'est le cas de l'amphotéricine B encapsulée en liposome (Ambisome®). L'amphotéricine B est un agent antifongique à très large spectre qui provoque des réactions secondaires importantes et notamment des insuffisances rénales. Son encapsulation dans des formulations lipidiques augmente considérablement son index thérapeutique (Andres et *al.*, Rev. Méd. Interne, 22 (2001) 141-150).

Afin de diminuer leur élimination rapide par le système réticuloendothélial, des systèmes de protection des liposomes ont été mis en place. Le plus efficace consiste à utiliser des phospholipides substitués par des polyéthylène glycols de masse moléculaire comprise entre 1000 et 5000 dans une proportion de 5 à 10% du mélange total de phospholipides. Les groupements polyéthylène glycol se répartissent à la surface des liposomes pour former une barrière hydrophile imperméable aux protéines plasmatiques ce qui empêche les phénomènes d'opsonisation. Les liposomes « invisibles », dits furtifs, ainsi formés (commercialisés sous le nom de marque Stealth liposomes®) ont des temps de rétention sanguins supérieurs aux liposomes conventionnels (45h contre quelques minutes à quelques heures). L'augmentation du temps de circulation sanguine de ces liposomes favorise leur accumulation dans les tissus cancéreux qui sont particulièrement irrigués, et leur utilisation pour le transport de composés anticancéreux est particulièrement appropriée (Gabizon et *al.*, Cancer Res. 54 (1994) 987-992). Une formulation de Stealth liposomes® à base de dauxorubicine (Doxil®, Alza Corp.) est actuellement commercialisée pour lutter contre le syndrome de Kaposi. Cependant certaines formulations constituées de liposomes de très petites tailles (50 nm) peuvent aussi être considérées comme des préparations à longue circulation. C'est le cas de la formulation anticancéreuse de daunorubicine commercialisée par NeXstar (DaunoXome®).

Pour effectuer un chargement optimal d'actifs à l'intérieur des liposomes, la méthodologie la plus efficace consiste à mettre en place un gradient de pH ou d'ammonium entre les compartiments intérieurs et extérieurs. Si ces méthodes s'avèrent efficaces pour le chargement d'actifs elles nécessitent l'utilisation de pH internes acides (2-3) qui peuvent induire l'hydrolyse des phospholipides membranaires. Afin de limiter ce phénomène il est possible d'utiliser des alkylamines susceptibles de traverser la membrane phospholipidique mais cette méthode rend encore plus complexe la formulation à mettre en place.

Afin d'assurer la stabilité mécanique des liposomes que ce soit lors de leur stockage ou de leur utilisation *in vivo*, plusieurs stratégies impliquant l'utilisation de polymères peuvent être envisagées :

La polymérisation des tensioactifs constitutifs de la membrane du liposome après sa formation (Bader et *al.*, Adv. Polym. Sci. 64 (1985) 1-62) et Hotz et *al.*, Adv. Mater. 10 (1998) 1387-1390).

5 L'interaction de polymères ioniques amphiphiles ou non à la surface de la membrane externe des liposomes (Hayashi et *al.*, Biochim. Biophys. Acta, 1280 (1996) 120-126, Ishihara et *al.*, Coll. and Surf., B : Biointerfaces 25 (2002) 325-333).

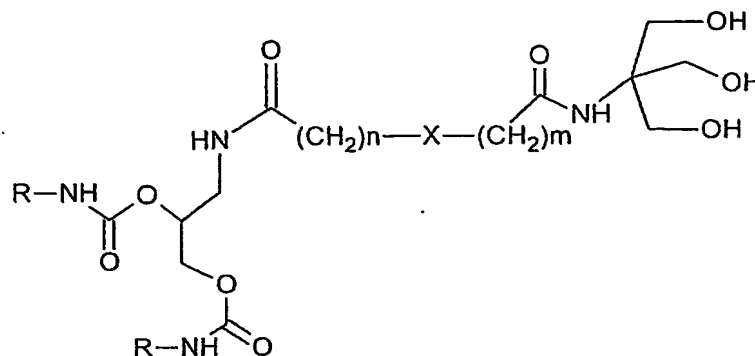
Enfin, la polymérisation d'un monomère hydrophile à l'intérieur de la cavité aqueuse interne du liposome est une méthode qui a été peu étudiée et qui a été décrite sommairement par Torchilin et *al.* (Makromol. Chem., Rapid communication, 8  
10 (1987) 457-460). Elle a été utilisée comme outil de fabrication d'empreinte moléculaire polymérisée dans un brevet américain (Perrot et *al.*, US patent n° 6217901, 17 avril 2001).

La limitation essentielle liée à l'utilisation de polymères pour stabiliser les liposomes est la toxicité potentielle induite par leur accumulation dans le lysosome ou par la toxicité propre du monomère hydrophile non polymérisé (cas de l'acrylamide). Afin  
15 de limiter ce phénomène il est crucial d'utiliser des polymères de bas poids moléculaires plus facilement biodégradables.

L'objectif de la présente invention est la mise au point de vecteurs nano particuliers à très faible coût de production et ayant la capacité de transporter à l'intérieur de leur cavité aqueuse interne une famille très large d'actifs hydrophiles. Les vecteurs nano  
20 particuliers de l'invention permettent l'encapsulation, la rétention et la libération de substances dosables. Les applications visées incluent le transport de principes actifs, notamment de principes actifs thérapeutiques, la délivrance épidermique de substances cosmétiques, le diagnostic médical. Notamment le transport d'actifs anticancéreux, d'actifs à usage vaccinal, de matériel génétique, d'enzymes, d'hormones, de vitamines, de sucres,  
25 de protéines et de peptides, de lipides, de molécules organiques et inorganiques.

Cet objectif a été atteint grâce à la conception et à la synthèse de nouveaux tensioactifs qui permettent de préparer des vecteurs nano particuliers ou liposomes dotés de propriétés avantageuses par rapport aux liposomes de l'art antérieur.

La présente invention a pour objet les composés répondant à la formule  
30 (I) :



(I)

dans laquelle :

X représente un atome de soufre S ou un groupement  $-\text{CH}_2-$  ;

5 n est un entier allant de 0 à 10, tel que par exemple 0, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 ;

m est un entier allant de 1 à 10, tel que par exemple 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 ;

lorsque  $\text{X}=\text{CH}_2$  alors  $1 < m+n < 7$  ;

R représente un groupement choisi parmi : les radicaux hydrocarbonés en  $\text{C}_4-\text{C}_{24}$  ; les radicaux hydrocarbonés fluorés en  $\text{C}_4-\text{C}_{24}$  ; les radicaux thioalkyls en  $\text{C}_4-\text{C}_{24}$ .

10 Le groupement R peut notamment être choisi parmi les radicaux suivants :

- Le radical thiooctyl

15 - Les radicaux hydrocarbonés en  $\text{C}_4-\text{C}_{24}$  tels que le n-butyle, le t-butyle, l'isobutyle, le n-pentyle, l'isopentyle, le n-hexyle, le n-heptyle, le n-octyle, le n-nonyl, le n-décyle, le n-undécyle, le n-dodécyle, le n-tridécyle, le n-tétradécyle, le n-pentadécyle, le n-hexadécyl, le n-heptadécyle, le n-octadécyle, le radical phtyl  $(\text{CH}_3[\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2)_3]_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2)$ ,

20 - Les radicaux hydrocarbonés fluorés en  $\text{C}_4-\text{C}_{24}$  tels que ceux répondant à la formule  $-(\text{CH}_2)_t-(\text{CF}_2)_r\text{F}$ , dans laquelle r et t représentent deux entiers avec :  $14 \geq r+t \geq 4$ , comme par exemple :

25  $-(\text{CF}_2)_4\text{F}$  ;  $-(\text{CF}_2)_5\text{F}$  ;  $-(\text{CF}_2)_6\text{F}$  ;  $-(\text{CF}_2)_7\text{F}$  ;  $-(\text{CF}_2)_8\text{F}$  ;  $-(\text{CF}_2)_9\text{F}$  ;  $-(\text{CF}_2)_{10}\text{F}$  ;  $-(\text{CF}_2)_{11}\text{F}$  ;  $-(\text{CF}_2)_{12}\text{F}$  ;  $-(\text{CF}_2)_{13}\text{F}$  ;  $-(\text{CF}_2)_{14}\text{F}$  ;  $-\text{CH}_2-(\text{CF}_2)_3\text{F}$  ;  $-\text{CH}_2-(\text{CF}_2)_4\text{F}$  ;  $-\text{CH}_2-(\text{CF}_2)_5\text{F}$  ;  $-\text{CH}_2-(\text{CF}_2)_6\text{F}$  ;  $-\text{CH}_2-(\text{CF}_2)_7\text{F}$  ;  $-\text{CH}_2-(\text{CF}_2)_8\text{F}$  ;  $-\text{CH}_2-(\text{CF}_2)_9\text{F}$  ;  $-\text{CH}_2-(\text{CF}_2)_{10}\text{F}$  ;  $-\text{CH}_2-(\text{CF}_2)_{11}\text{F}$  ;  $-\text{CH}_2-(\text{CF}_2)_{12}\text{F}$  ;  $-\text{CH}_2-(\text{CF}_2)_{13}\text{F}$  ;  $-(\text{CH}_2)_2-(\text{CF}_2)_2\text{F}$  ;  $-(\text{CH}_2)_2-(\text{CF}_2)_3\text{F}$  ;  $-(\text{CH}_2)_2-(\text{CF}_2)_4\text{F}$  ;  $-(\text{CH}_2)_2-(\text{CF}_2)_5\text{F}$  ;  $-(\text{CH}_2)_2-(\text{CF}_2)_6\text{F}$  ;  $-(\text{CH}_2)_2-(\text{CF}_2)_7\text{F}$  ;  $-(\text{CH}_2)_2-(\text{CF}_2)_8\text{F}$  ;  $-(\text{CH}_2)_2-(\text{CF}_2)_9\text{F}$  ;  $-(\text{CH}_2)_2-(\text{CF}_2)_{10}\text{F}$  ;  $-(\text{CH}_2)_2-(\text{CF}_2)_{11}\text{F}$  ;  $-(\text{CH}_2)_2-(\text{CF}_2)_{12}\text{F}$  ;  $-(\text{CH}_2)_3-(\text{CF}_2)_1\text{F}$  ; ...,  $-(\text{CH}_2)_{13}-(\text{CF}_2)\text{F}$  ;  $-(\text{CH}_2)_4(\text{CF}_2)_6\text{F}$  ;  $-(\text{CH}_2)_4(\text{CF}_2)_8\text{F}$  ;  $(\text{CH}_2)_4(\text{CF}_2)_{10}\text{F}$  ;  $-(\text{CH}_2)_{10}(\text{CF}_2)_6\text{F}$  ;  $-(\text{CH}_2)_{10}(\text{CF}_2)_8\text{F}$  ;  $-(\text{CH}_2)_{10}(\text{CF}_2)_{10}\text{F}$ .....

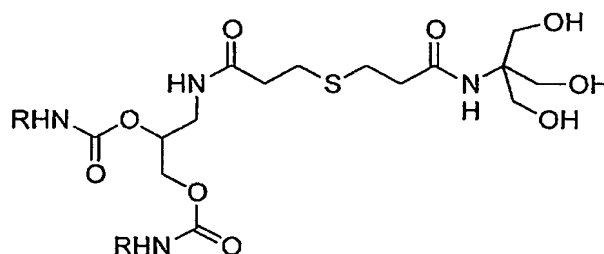
30 Les chaînes R préférées sont celles qui contribuent à donner au tensioactif de formule (I) une température de transition de phase supérieure à  $37^\circ\text{C}$ . En

effet, lorsque de tels tensioactifs sont utilisés pour la fabrication de liposomes, ces tensioactifs, possédant une structure cristalline à température physiologique, apportent à la membrane des liposomes une rigidité supérieure et un degré de rétention plus important des solutés encapsulés dans le compartiment aqueux interne. De préférence R représente  
 5 une chaîne hydrocarbonée en  $C_{12}$ - $C_{24}$  ou une chaîne hydrocarbonée fluorée en  $C_8$ - $C_{24}$ .

Préférentiellement l'une ou plusieurs des conditions suivantes sont vérifiées :  $X=S$  ;  $n=2$ ,  $m=2$ .

Les composés de formule (I) préférés sont ceux répondant à la formule A dans laquelle R a la même définition que ci-dessus  $n=2$ ,  $X=S$ ,  $m=2$  :

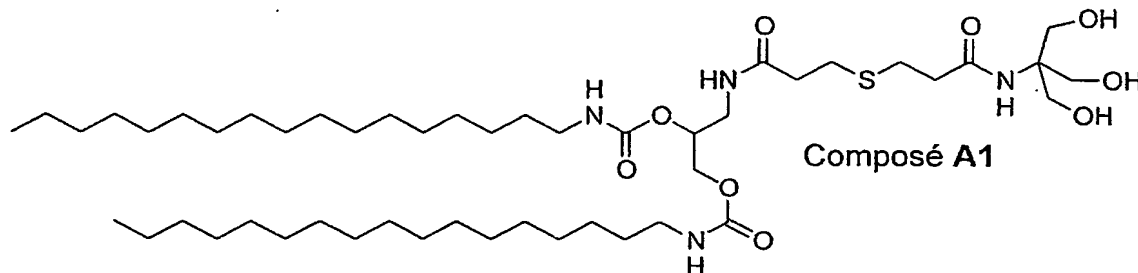
10



Formule A

Parmi ceux-ci, un composé particulièrement préféré est A1 représenté ci-dessous :

15



Composé A1

La synthèse des molécules de formule (I) peut être faite de façon simple en utilisant les méthodes classiques de la synthèse organique. Plusieurs exemples de  
 20 synthèse sont illustrés dans la partie expérimentale.

Un second objet de l'invention consiste dans l'utilisation des molécules de formule (I) pour la fabrication de liposomes. Les liposomes sont des dispersions aqueuses de vésicules dont les parois sont formées d'une ou de plusieurs bicouches d'agents amphiphiles, renfermant un espace interne aqueux. Les liposomes de l'art  
 25 antérieur ont leurs parois généralement constituées de phospholipides.

Les liposomes sont fabriqués à partir des tensioactifs de formule (I) très facilement par la méthode du film (liposomes, a practical approach, R.R.C. New, Ed.,



Oxford University Press, New-York, 1990). Ce procédé peut être résumé de la façon suivante :

- Dissolution d'un composé de formule (I) dans un alcool ou dans un solvant chloré ;
- 5       - Evaporation du solvant ;
- Addition d'eau à une température allant de 40 à 80°C à une concentration allant de 0,5 à 10 mg/ml ;
- Traitement :
  - soit aux ultrasons à une température supérieure à la température
  - 10 de transition de phase du composé (I)
  - soit par extrusion de la solution à travers un ou plusieurs filtres de porosité appropriée,
  - jusqu'à l'obtention d'une solution translucide bleutée.

De façon plus détaillée : une solution de tensioactif dissous dans du

15 méthanol ou du chloroforme est évaporée lentement dans un ballon afin de former un film fin sur la paroi du ballon. De l'eau distillée à 65°C est additionnée afin de réhydrater le film, à une concentration de 2,5 mg/ml. La solution obtenue est ensuite soumise aux ultrasons pendant 30 minutes dans un bain de sonication à une température supérieure à la

20 température de transition de phase du tensioactif dispersé jusqu'à obtention d'une solution translucide bleutée. On peut également pour cette dernière étape remplacer la sonication par une extrusion répétée de la solution au travers de deux filtres de polycarbonate de porosité 200nm, montés en série. Un double traitement de sonication et d'extrusion peut également être prévu.

D'autres méthodes classiques de préparation de liposomes peuvent être

25 utilisés pour la préparation des liposomes de l'invention. On peut à cet effet se reporter à S. Vemuri et C.T.Rhodes, *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 70, (1995), 95-111.

De façon étonnante on observe la formation de vésicules de forme allongée, désignées vésicules tubulaires en raison de leur taille, qui est de l'ordre de quelques dizaines de nanomètre, et de leur forme qui rappelle celle d'un tube fermé à ses

30 deux extrémités.

La taille et la stabilité mécanique dans le temps des particules obtenues dans la solution ont été mesurées après filtration par diffraction dynamique de la lumière (High Performance Particle Sizer, Malvern). La nature des particules obtenues a été étudiée par microscopie électronique par transmission après coloration négative de l'échantillon ou

35 après cryofracture (figure 4).

Les mesures de forme et de taille établies par l'observation des clichés de microscopie électronique ont permis de mettre en évidence la formation de liposomes de forme allongée dénommés vésicules tubulaires, refermés à leurs extrémités, dont la section

moyenne est comprise entre 20 et 80 nm et la longueur moyenne est comprise entre 200 et 500 nm (figure 3). Les analyses en cryofracture ont confirmé la formation de ces vésicules tubulaires et leurs caractéristiques morphologiques à savoir la présence d'une cavité aqueuse interne isolée du milieu extérieur (figure 5).

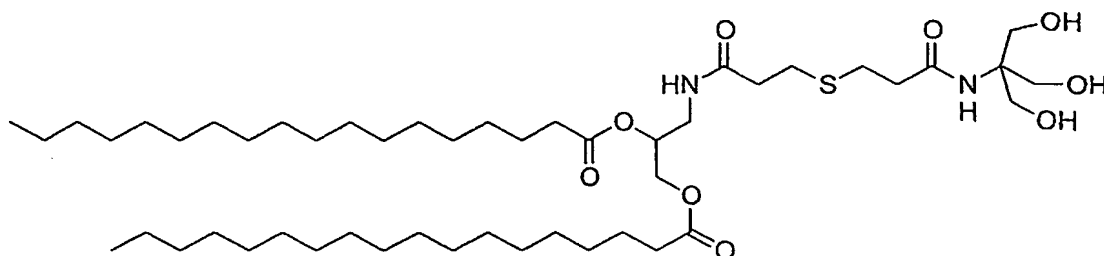
5 Pour un tensioactif de formule (I) donné la taille des particules est sensiblement homogène : elle varie dans une fourchette de valeur de  $\pm 10\%$ , préférentiellement de  $\pm 5\%$ , autour d'une valeur centrale de longueur et de diamètre.

Ces vésicules tubulaires ont une stabilité relativement élevée puisque l'on n'observe aucune évolution de la taille des particules après un an de stockage tandis que  
10 des liposomes formés de phosphatidyl choline de jaune d'œuf montrent une évolution après seulement 5 jours de stockage.

La mise en évidence de la cavité interne aqueuse a été prouvée indirectement par des mesures spectrofluorimétriques de l'encapsulation et des cinétiques de relargage d'une sonde fluorescente hydrophile, la carboxyfluorescéine. Les mesures  
15 montrent clairement une cinétique de relargage plus lente de la sonde fluorescente comparée à une encapsulation traditionnelle dans un mélange de phosphatidyl choline de jaune d'œuf (figure 1).

Nous avons pu mettre en évidence que les liaisons hydrogène intermoléculaires entre les tensioactifs constituant les vésicules tubulaires étaient à  
20 l'origine de leur morphologie et de leur stabilité particulière. En effet, les fonctions alcool du tris(hydroxyméthyl) aminométhane ainsi que les fonctions carbamate ont la propriété de pouvoir générer un réseau de liaisons hydrogène entre les tensioactifs constituant la membrane, stabilisant ainsi les vésicules tubulaires. Ceci a pu être mis en évidence par spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier en phase liquide (dans  $\text{CCl}_4$ ). On note  
25 en effet, sur le spectre une augmentation de l'intensité de la bande à  $1691\text{ cm}^{-1}$  caractéristique des fonctions carbonyles liées à un atome d'hydrogène, lorsque la concentration en tensioactif dans la solution augmente au détriment de son homologue non lié (figure 2).

Il est à noter que la substitution dans le tensioactif de formule (I) des  
30 liaisons carbamate par des liaisons ester entre les chaînes grasses et le motif glycérol, comme illustré dans la structure B, conduit à la formation dans l'eau de liposomes de structures traditionnelles dont la stabilité mécanique est seulement de quelques heures, confirmant ainsi l'hypothèse émise de stabilisation et d'organisation des vésicules tubulaires par l'établissement de liaisons hydrogène particulières (figure 6).

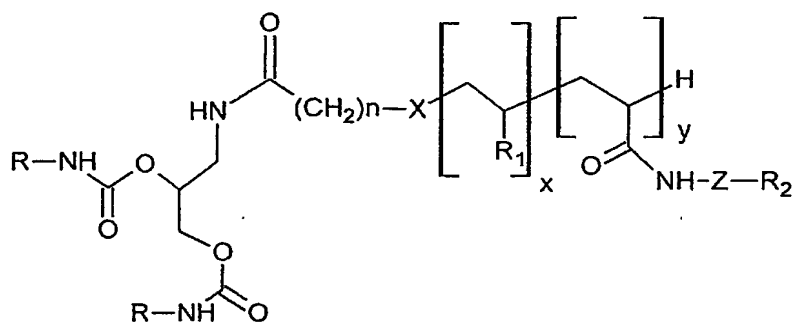


Structure B

L'invention a en outre pour objet des liposomes, ou dispersions aqueuses de vésicules, caractérisés en ce qu'ils comportent un ou plusieurs composés de formule (I) comme constituants de leurs parois.

Ces liposomes présentent des caractéristiques de structure originales qui leurs confèrent des propriétés inattendues, en particulier une stabilité améliorée par rapport aux liposomes de l'art antérieur. Les liposomes de l'invention ont également montré une capacité à libérer un principe actif sur une plus longue durée par rapport aux liposomes de l'art antérieur.

Outre les composés de formule (I), les liposomes de l'invention comportent en outre de préférence au moins un composé répondant à la formule (II) ci-dessous :



(II)

dans laquelle :

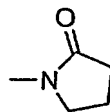
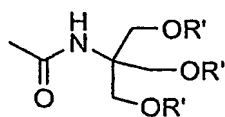
- X représente un atome de soufre S ou un groupement  $-\text{CH}_2-$  ; de préférence X représente S ;

- n est un entier allant de 0 à 10, tel que par exemple 0, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 ; de préférence  $n=2$  ;

- x représente 0 ou un entier allant de 1 à 30 ; tel que par exemple 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15... ;

- y représente 0 ou un entier allant de 1 à 10, tel que par exemple 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 ;

-  $R_1$  représente un groupement hydrophile. De préférence  $R_1$  peut être choisi parmi les radicaux suivants :



dans lesquels R' représente H ou un groupement destiné à favoriser la solubilisation de la molécule (II) dans l'eau. R' peut par exemple être un composé hydrocarboné polyhydroxylé en C<sub>4</sub>-C<sub>24</sub>, notamment il peut être choisi parmi les sucres comme par exemple le galactose, le glucose, le mannose, l'acide sialique, lié par son carbone anomère.

- R<sub>2</sub> représente un groupement de reconnaissance qui est choisi en fonction de la cible cellulaire, de préférence il est choisi parmi les groupements ayant une affinité prononcée pour la cible biologique du principe actif véhiculé dans le vésicule tubulaire.

R<sub>2</sub> peut être de nature saccharidique (ciblage des lectines membranaires spécifiques qui se retrouvent dans des tissus particuliers et qui reconnaissent sélectivement soit le galactose –cas du foie, des os, de certaines tumeurs cancéreuses-, soit le mannose –cas des macrophages, du cœur-, soit l'acide sialique- cas des érythrocytes -...), de nature hormonale (tels que des stéroïdes), de nature synthétique tel que le gleevek pour cibler les kinases, des anticorps spécifiques, la biotine qui se lie à certaines protéines spécifiques; ...et plus généralement tous substrats dont les recherches antérieures ont démontré la spécificité de reconnaissance.

R<sub>2</sub> peut être choisi parmi des anticorps ou des fragments d'anticorps, des petites molécules effectrices permettant l'interaction avec des récepteurs de surface cellulaires, des antigènes, des sucres, des peptides et d'autres composés qui permettent d'assurer le ciblage spécifique de certaines cellules ou tissus cibles. On peut citer, par exemple, parmi les peptides utilisables dans la présente invention : la séquence RGD, connue pour son affinité pour les intégrines αVβ3, l'acide folique, le thalidomide connu pour son affinité pour les sites d'angiogénèse.

On peut prévoir qu'une même molécule de formule (II) comporte un ou plusieurs groupements R<sub>2</sub> de reconnaissance identiques ou plusieurs groupements de reconnaissance R<sub>2</sub> différents, ce qui permet de diriger les liposomes vers plusieurs cibles biologiques distinctes.

- R représente un groupement choisi parmi : les radicaux hydrocarbonés en C<sub>4</sub>-C<sub>24</sub> ; les radicaux hydrocarbonés fluorés en C<sub>4</sub>-C<sub>24</sub> ; les radicaux thioalkyls en C<sub>4</sub>-C<sub>24</sub>.

Le groupement R peut notamment être choisi parmi les radicaux suivants :

- Le radical thiooctyl

- Les radicaux hydrocarbonés en C<sub>4</sub>-C<sub>24</sub> : le n-butyle, le ter-butyle, l'isobutyle, le n-pentyle, l'isopentyle, le n-hexyle, le n-heptyle, le n-octyle, le n-nonyle, le n-décyle, le n-undécyle, le n-dodécyle, le n-tridécyle, le n-tétradécyle, le n-pentadécyle, le n-hexadécyl, le n-heptadécyle, le n-octadécyle, radical phtyl  
 5 (CH<sub>3</sub>[CH(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>]<sub>3</sub>CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>) ...

- Les radicaux hydrocarbonés fluorés en C<sub>4</sub>-C<sub>24</sub> : on peut citer ceux répondant à la formule -(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-(CF<sub>2</sub>)<sub>t</sub>F, dans laquelle r et t représentent deux entiers avec : 14 ≥ r+t ≥ 4, tels que par exemple : -(CF<sub>2</sub>)<sub>4</sub>F ; -(CF<sub>2</sub>)<sub>5</sub>F ; -(CF<sub>2</sub>)<sub>6</sub>F ; -(CF<sub>2</sub>)<sub>7</sub>F ; -(CF<sub>2</sub>)<sub>8</sub>F ; -(CF<sub>2</sub>)<sub>9</sub>F ; -(CF<sub>2</sub>)<sub>10</sub>F ; -(CF<sub>2</sub>)<sub>11</sub>F ; -(CF<sub>2</sub>)<sub>12</sub>F ; -(CF<sub>2</sub>)<sub>13</sub>F ; -(CF<sub>2</sub>)<sub>14</sub>F ; -CH<sub>2</sub>-(CF<sub>2</sub>)<sub>3</sub>F ; -CH<sub>2</sub>-(CF<sub>2</sub>)<sub>4</sub>F ; -CH<sub>2</sub>-(CF<sub>2</sub>)<sub>5</sub>F ; -CH<sub>2</sub>-(CF<sub>2</sub>)<sub>6</sub>F ; -CH<sub>2</sub>-(CF<sub>2</sub>)<sub>7</sub>F ; -CH<sub>2</sub>-(CF<sub>2</sub>)<sub>8</sub>F ; -CH<sub>2</sub>-(CF<sub>2</sub>)<sub>9</sub>F ; -CH<sub>2</sub>-(CF<sub>2</sub>)<sub>10</sub>F ; -CH<sub>2</sub>-(CF<sub>2</sub>)<sub>11</sub>F ; -CH<sub>2</sub>-(CF<sub>2</sub>)<sub>12</sub>F ; -CH<sub>2</sub>-(CF<sub>2</sub>)<sub>13</sub>F ; -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CF<sub>2</sub>)<sub>2</sub>F ; -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CF<sub>2</sub>)<sub>3</sub>F ; -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CF<sub>2</sub>)<sub>4</sub>F ; -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CF<sub>2</sub>)<sub>5</sub>F ; -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CF<sub>2</sub>)<sub>6</sub>F ; -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CF<sub>2</sub>)<sub>7</sub>F ; -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CF<sub>2</sub>)<sub>8</sub>F ; -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CF<sub>2</sub>)<sub>9</sub>F ; -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CF<sub>2</sub>)<sub>10</sub>F ; -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CF<sub>2</sub>)<sub>11</sub>F ; -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CF<sub>2</sub>)<sub>12</sub>F ; -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-(CF<sub>2</sub>)<sub>1</sub>F ; ...-(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>-(CF<sub>2</sub>)F ; -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>(CF<sub>2</sub>)<sub>6</sub>F ; -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>(CF<sub>2</sub>)<sub>8</sub>F ; (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>(CF<sub>2</sub>)<sub>10</sub>F ; -(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>(CF<sub>2</sub>)<sub>6</sub>F ; -(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>(CF<sub>2</sub>)<sub>8</sub>F ; -(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>(CF<sub>2</sub>)<sub>10</sub>F.....  
 10  
 15

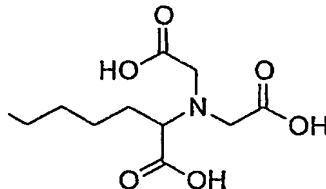
- Z est un bras espaceur qui relie le groupement de reconnaissance R<sub>2</sub> à la chaîne polymérique. Z est lié à R<sub>2</sub> au moyen d'une liaison qui peut être choisie parmi les fonctions -O-CO-, -CO-NH-, -NH-CO-NH-, -NH-CO-O-, O-CO-O-, -O-, -CH=N-, -S- ou par complexation d'un atome de nickel (Chikh et *al.*, Biochim. Biophys. Acta, 1567  
 20 (2002) 204-212). Celui ci peut se lier d'une part à un tag de polyhistidine fixé sur l'agent de ciblage et d'autre part à un polyacide de type NTA fixé sur la chaîne polymérique.

Le bras espaceur Z peut être constitué d'une chaîne peptidique. Celle-ci peut être fixée sur la chaîne oligomérique par l'intermédiaire de la chaîne latérale ou principale de l'acide aminé situé en extrémité. Ce bras espaceur comprend 1 à 5 acides aminés, préférentiellement 1 à 3 acides aminés.  
 25

Les acides aminés constituant le bras espaceur Z, sont choisis parmi les acides aminés naturels comme l'alanine, l'arginine, l'asparagine, l'acide aspartique, la cystéine, la glutamine, l'acide glutamique, la glycine, l'histidine, l'isoleucine, la leucine, la lysine, la méthionine, la phénylalanine, la proline, la sérine, la thréonine, le tryptophane, la tyrosine, la valine, ou les acides aminés non naturels tels que l'hydroxyproline, la norleucine, l'ornithine, la citrulline, la cyclohexylalanine. Ce bras écarteur Z peut être constitué d'un résidu tyrosine permettant le suivi *in vivo* du vésicule tubulaire après marquage à <sup>125</sup>I ou <sup>131</sup>I.  
 30

On peut également envisager d'employer comme groupement Z des acides Ω-aminés tels que l'acide 3-aminopropionique et l'acide 4-amino-butyrique, mais également l'éthanolamine, la 3-propanolamine ou des diamines de formule -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-NH- dans laquelle p représente un entier allant de 2 à 6.  
 35

Lors d'une liaison par complexation d'un atome de nickel, le groupement -Z-R<sub>2</sub> est constitué par un groupement NTA de formule :



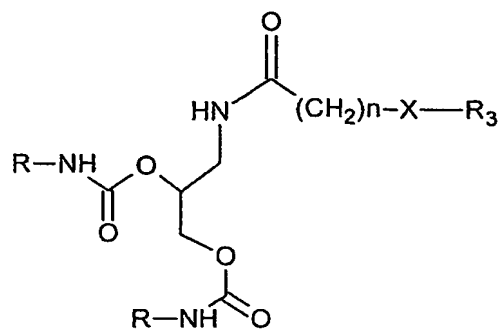
De préférence, les liposomes ou vésicules tubulaires de l'invention  
5 comportent de 1 à 5% d'un ou plusieurs composés de formule (II) ce qui permet de favoriser le ciblage de ces liposomes vers leur cible biologique sans altérer leur organisation.

Ces télomères lipidiques (II) présentent l'avantage grâce à leur partie  
hydrophile oligomérique de pouvoir éloigner les agents de reconnaissance greffés de la  
10 surface des vésicules tubulaires, favorisant ainsi leur reconnaissance par les cellules ou les tissus cibles. L'autre avantage lié à l'utilisation de ces lipides de ciblage (II) est la possibilité de multiplier les motifs de reconnaissance sur un seul composé grâce à la technique de télomérisation. Les facteurs x et y sont en effet faciles à contrôler et vont dépendre assez étroitement de la proportion de monomères et d'agent télogène mis en  
15 réaction.

La ligation des agents de reconnaissance peut être réalisée avant la  
télomérisation de la tête hydrophile si il y a compatibilité avec les conditions  
réactionnelles. Les agents de reconnaissance peuvent également être fixés sur la tête  
polaire oligomérique après formation des vésicules tubulaires. La partie hydrophile  
20 télomérisée est alors fonctionnalisée par des groupements susceptibles d'assurer le couplage avec ces agents de reconnaissance. Les différentes techniques de couplage susceptibles d'être utilisées sont bien connues de l'homme du métier et elles sont notamment décrites dans : Allen et *al.*, Biochim. Biophys. Acta, 1237 (1995) 99-108 ; Sapra, Prog. Lipids Res., 42 (2003) 439-462, Hansen et *al.*, Biochim. Biophys. Acta, 1239  
25 (1995) 133-144.

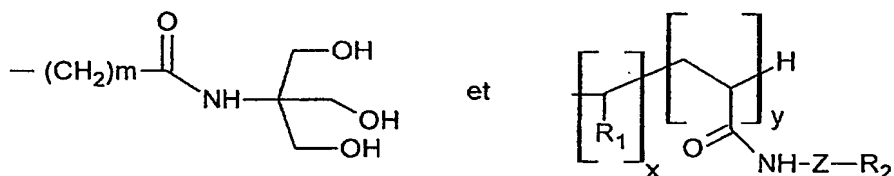
Les composés de formule (II) constituent un autre objet de l'invention.

Les composés de formule (I) et de formule (II) peuvent être regroupés sous une formule commune (III) :



(III)

dans laquelle X, n et R ont la même définition que dans les formules (I) et (II) et R<sub>3</sub> représente un groupement choisi parmi :



m ayant la même signification que dans la formule (I)

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, Z, x et y ayant la même signification que dans la formule (II)

Selon une variante préférée de l'invention, les liposomes ou vésicules tubulaires de l'invention sont stabilisés par télomérisation ou polymérisation d'un monomère de type acrylique contenu dans leur cavité aqueuse interne.

De manière à limiter le relargage des solutés encapsulés dans ces vésicules tubulaires et à augmenter leur stabilité mécanique il est possible d'introduire à l'intérieur du compartiment aqueux interne des vésicules tubulaires une matrice oligomérique ou polymérique. La matrice oligomérique est fabriquée après encapsulation du ou des monomères constitutifs dans les vésicules tubulaires et élimination des monomères non encapsulés par des techniques de séparation sur gel d'exclusion de taille. La télomérisation, qui consiste à former le polymère en présence d'un agent de transfert de chaîne, permet d'accéder à des petits polymères de taille contrôlée. La masse moléculaire réduite de ce polymère favorise son élimination par voie rénale. En évitant l'accumulation de polymère dans le lysosome on évite également des problèmes de toxicité.

Les liposomes ou vésicules tubulaires comprenant, outre les tensioactifs de formule (I), au moins un oligomère ou télomère tel que décrit ci-dessous constituent un autre objet de l'invention.

L'oligomère ou le télomère est constitué de blocs de construction monomériques, hydrophiles, ioniques ou non ioniques, choisis parmi les dérivés acide acrylique, acide méthacrylique, méthacrylamide, ainsi que les dérivés acrylate,

méthacrylate, acrylamide et méthacrylamide d'alcools en C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, de polyols en C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, de sucres et d'acides aminés.

Ces sucres peuvent être

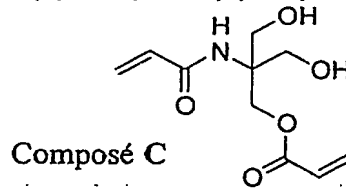
- Des sucres simples tels que : le glucose, ribose, arabinose, xylose, lyxose, allose, altrose, mannose, galactose, fructose, talose.

- Des disaccharides tels que le maltose, le saccharose, ou le lactose

Les acides aminés peuvent être choisis parmi les acides aminés naturels comme l'alanine, l'arginine, l'asparagine, l'acide aspartique, la cystéine, la glutamine, l'acide glutamique, la glycine, l'histidine, l'isoleucine, la leucine, la lysine, la méthionine, la phénylalanine, la proline, la sérine, la thréonine, le tryptophane, la tyrosine, la valine, ou les acides aminés non naturels tels que l'hydroxyproline, la norleucine, l'ornithine, la citrulline, la cyclohexylalanine.

Parmi les monomères commercialement disponibles utilisables dans le procédé de l'invention, on peut mentionner par exemple : Le Tris(hydroxy)méthyl acrylamidométhane, l'acrylate de sodium, l'hydroxyéthyl acrylate, le glucose monoacrylate, le glucose-1-(N-méthyl)acrylamide, le glucose 2-acrylamide, le maltose 1-acrylamide, le monoacrylate de sorbitol.

Afin de modifier les capacités de rétention et de stabilisation du télomère il est possible d'utiliser dans la fabrication du télomère des agents de réticulation hydrosolubles tels que : le glucose-1,2-diacrylamide, le sorbitol diacrylate, le saccharose diacrylate, le saccharose di(éthylènediamine acrylamide), le kanamycine tétracrylamide, le kanamycine diacrylamide, ou d'autres sucres di ou polyfonctionnalisés par des acrylates ou des acrylamides. En règle générale tous les composés hydrophiles susceptibles de recevoir au moins deux groupements acrylate ou acrylamide peuvent être utilisés. C'est le cas par exemple du dérivé acrylate de tris(hydroxyméthyl) acrylamidométhane (composé C):

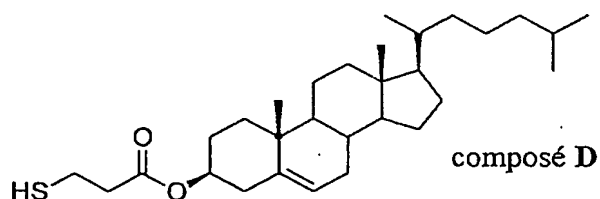


Ces agents de réticulation sont utilisés dans des proportions allant de 1 à 5% en poids par rapport au poids du ou des monomères.

La taille du télomère est contrôlée en utilisant un ou plusieurs agents de transfert hydrophiles ou hydrophobes qui sont insérés dans la membrane ou la cavité aqueuse interne des vésicules tubulaires. L'agent de transfert de chaîne peut être hydrophile ou hydrophobe, de type thiol ou phosphite, il est préférentiellement radicalaire. Les agents de transfert de chaîne employés sont choisis parmi les thiols hydrophiles tels que l'acide thiol acétique, l'acide mercaptopropionique, le thioéthylène glycol...la

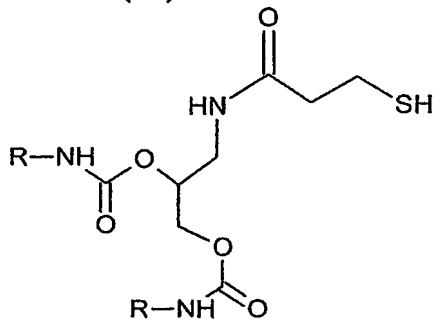


cystamine, la cystéine...ou les thiols hydrophobes tels que les alcane thiols de  $C_2$  à  $C_{30}$ , comme par exemple le composé D (dérivé du cholestérol) qui est connu pour sa capacité à s'intégrer dans les membranes phospholipidiques.



L'agent de transfert de chaîne peut encore être choisi parmi les thiols bicaténaires précédemment décrits. Les phosphites peuvent quant à eux être hydrophiles tels que le phosphite de diéthyle ou hydrophobes tels que les phosphites de dioctyle, didodécyle, dihexadécyle.

Afin d'éviter de désorganiser la membrane des vésicules tubulaires il est préférable que la structure hydrophobe de ces thiols hydrophobes se rapproche de celle des tensioactifs la constituant. Le motif commun de ces agents télogènes est avantageusement constitué d'un motif aminoglycérol sur lequel sont greffées des chaînes grasses par des liaisons carbamate suivant la formule (IV) :



(IV)

dans laquelle R a la même signification que dans les formules (I) (II) et (III) ci-dessus.

Afin de moduler le degré de polymérisation il est possible de faire varier la proportion d'agent de transfert de chaîne incorporée dans la membrane par rapport à la quantité de monomères encapsulés. Cette proportion est toutefois limitée par la solubilité maximale de l'agent de transfert de chaîne dans la membrane lipidique dans le cas où l'agent de transfert de chaîne est hydrophobe. Le rapport de l'agent de transfert de chaîne / tensioactif lipidique (I) varie préférentiellement de 1 à 10% en poids/poids. Le rapport agent de transfert de chaîne / monomère varie de 0,1 à 10 % en poids/poids.

La polymérisation peut être initiée de façon connue par irradiation ultraviolette ou par des photoinitiateurs, par des couples d'initiateurs redox, par la chaleur ou par des initiateurs radicalaires thermiques et plus généralement par toutes les techniques

classiques décrites dans la littérature (G. Odian, Principles of polymerization, 3<sup>sup</sup>.rd Ed, Wiley, New York, 1991).

A la fin de la polymérisation, la cavité aqueuse interne des vésicules tubulaires comporte un télomère hydrophile muni éventuellement d'une partie hydrophobe  
 5 télogène intégrée dans le feuillet membranaire interne. La description physico-chimique de ces vésicules tubulaires stabilisées est donnée dans la partie expérimentale et leur capacité de rétention supérieure d'un soluté encapsulé et leur stabilité mécanique accrue sont démontrées.

Les applications visées incluent le transport de principes actifs, notamment de principes actifs thérapeutiques, la délivrance épidermique de substances  
 10 cosmétiques, les agents de diagnostic médical. Notamment le transport d'actifs anticancéreux, de vaccins, de matériel génétique, d'enzymes, d'hormones, de vitamines, de sucres, de protéines et de peptides, de lipides, de molécules organiques et inorganiques.

Dans le cadre d'une utilisation vaccinale, les épitopes et peptides  
 15 pourront être incorporés dans la matrice aqueuse interne ou exprimés à la surface des vésicules tubulaires par un système de liaison covalente afin d'améliorer la réponse immunitaire des épitopes.

La présente invention a donc en outre pour objet toute composition, notamment toute composition thérapeutique, de diagnostic ou cosmétique comprenant au  
 20 moins un principe actif en association avec un liposome tel que décrit ci-dessus, et en particulier toute composition comprenant au moins un principe actif encapsulé dans un liposome ou vésicule tubulaire selon la présente invention.

## PARTIE EXPERIMENTALE

### FIGURES :

La figure 1 illustre la cinétique de libération de la carboxyfluorescéine encapsulée dans des liposomes de phosphatidyl choline (+) et des vésicule tubulaires constitués du composé A1 (●) mesurée en spectrofluorimétrie.

La figure 2 représente le spectre infra rouge en phase liquide d'une  
 30 solution du composé A1 dans CCl<sub>4</sub> à différentes concentrations ( $1.10^{-2}$  à  $2,5.10^{-4}$ M).

La figure 3 représente la courbe de distribution en taille par volume des vésicules tubulaires, mesurée par microscopie électronique.

La figure 4 est une photographie obtenue par microscopie électronique par transmission de phase après coloration négative à l'acétate d'uranyle 2% de vésicules  
 35 tubulaires formées par dispersion du composé A1 ( $2,5 \text{ mg.ml}^{-1}$ ) dans l'eau.

La figure 5 est une photographie obtenue par microscopie électronique par transmission de phase après cryofracture d'un échantillon de vésicules tubulaires formées par dispersion du composé A1 ( $2,5 \text{ mg.ml}^{-1}$ ) dans l'eau.

La figure 6 est une photographie obtenue par microscopie électronique par transmission de phase après coloration négative à l'acétate d'uranyle 2% d'un échantillon de vésicules tubulaires formées par dispersion du composé de structure B (2,5 mg.mL<sup>-1</sup>) dans l'eau.

5                    Exemple 1 : synthèse du dérivé A1

La synthèse du dérivé A1 est résumée dans le schéma 1

- Acide trityl mercaptopropionique (1)

5 g d'acide mercaptopropionique (47,16 mmoles) sont dissous dans 15 mL de dichlorométhane fraîchement distillé. Une solution de chlorure de trityle (15,7 g, 56,6 mmoles) dans 10 mL de dichlorométhane est additionnée goutte à goutte. Le milieu réactionnel est maintenu à température ambiante pendant 3h. Le précipité formé est filtré et rincé abondamment avec de l'éther. On obtient après séchage le produit pur sous la forme d'une poudre blanche (15,6 g, Rdt : 95 %).

15

- rac-*N*-(2,3-Dihydroxy-propyl)-3-(tritylmercapto) propionamide (2)

2 g d'acide 3-(tritylmercapto) propanoïque (5,75 mmol), 0,523 g d'aminopropane diol (1 éq) et 1,7 g de *N*-(Ethoxycarbonyl)-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline (EEDQ) (6,9 mmol, 1,2 éq) sont solubilisés dans 50 mL de dichlorométhane. Le milieu réactionnel est chauffé à reflux durant 16 heures. Le brut réactionnel est ensuite lavé avec une solution de bicarbonate de sodium saturée puis avec une solution d'acide chlorhydrique normale, saturée en chlorure de sodium avant d'être séché sur sulfate de sodium. Après filtration sur verre fritté, le produit est purifié par chromatographie sur gel de silice avec élution par un gradient d'acétate d'éthyle pur à acétate d'éthyle/méthanol 9 : 1 (v : v)). Le produit pur est obtenu sous la forme d'une poudre blanche (2,12 g, Rdt : 87%).

Le produit peut aussi être obtenu pur, avec un rendement identique, par cristallisation à température ambiante du brut réactionnel dans un mélange acétate d'éthyle/méthanol 8 : 2 (v : v) en 8 jours.

30                    RMN <sup>1</sup>H(/CDCl<sub>3</sub>) : δ (ppm) 7,40-7,25 (15H, m, aromatiques du trityle) ; 5,86 (1H, t, NH) ; 3,7 (1H, m, CHOH) ; 3,51 (2H, m, CH<sub>2</sub>OH) ; 3,31 (2H, m, CH<sub>2</sub>NH) ; 3,09 (2H, m, OH) ; 2,50 (2H, t, CH<sub>2</sub>S) ; 2,04 (2H, m, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO).

35                    RMN <sup>13</sup>C(/CDCl<sub>3</sub>) : δ (ppm) 172,9 (CH<sub>2</sub>CONH) ; 144,6 (SCC phényle) ; 129,6 (C<sub>para</sub> phényle) ; 128,0 (C<sub>ortho</sub> phényle) ; 126,8 (C<sub>méta</sub> phényle) ; 70,9 (CHOH) ; 66,9 (SCPh<sub>3</sub>) ; 63,6 (CH<sub>2</sub>OH) ; 42,1 (NHCH<sub>2</sub>CH) ; 35,3 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO) ; 27,6 (CH<sub>2</sub>S).

- Rac-2,3-di[*N*-(heptadécyl)carbamoyloxy-propyl]-3-(tritylmercapto) propionamide (3)

2 g de rac-*N*-(2,3-Dihydroxy-propyl)-3-(*trityl*mercapto) propionamide (4,75 mmol) et 2,8 g de 1-Isocyanato-heptadecane (9,97 mmol, 2,1 éq) sont solubilisés dans 50 mL de toluène fraîchement distillé, à température ambiante et sous bullage d'argon. Le milieu réactionnel est porté au reflux et une pointe de spatule de 1,4-diaza bicyclo-[2,2,2]-octane (DABCO) (cat.) est ajoutée au mélange. Au bout de 6 heures, le brut est évaporé à sec et repris dans un minimum d'éther où le produit cristallise à température ambiante. Après filtration, le produit est obtenu pur sous la forme d'une poudre blanche (4,04 g, Rdt : 86 %).

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) 7,47-7,23 (15H, m, aromatiques du trityle) ; 6,02 (1H, t, NH) ; 4,95-4,74 (3H, m,  $\text{CHO}$ ,  $\text{CH}_2\text{O}$ ) ; 4,18 (2H, m, NH) ; 3,44 (2H, t,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ) ; 3,12 (4H, q,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ) ; 2,51 (2H, t,  $\text{CH}_2\text{S}$ ) ; 2,06 (2H, t,  $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ) ; 1,49 (4H, m,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2$ ) ; 1,28 (54H, m,  $\text{CH}_2$  chaînes) ; 0,91 (6H, t,  $\text{CH}_3$ ).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) 171,2 ( $\text{CH}_2\text{CONH}$ ) ; 156,1-155,9 ( $\text{OCONH}$ ) ; 144,7 ( $\text{SCC}$  phényl) ; 129,6 ( $\text{C}_{\text{para}}$  phényl) ; 127,9 ( $\text{C}_{\text{ortho}}$  phényl) ; 126,7 ( $\text{C}_{\text{méta}}$  phényl) ; 71,2 ( $\text{CHO}$ ) ; 66,8 ( $\text{SCPh}_3$ ) ; 63,4 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ) ; 41,2 ( $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ) ; 40,0 ( $\text{NHCH}_2\text{CH}$ ) ; 35,5 ( $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ) ; 31,9 ( $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ) ; 29,9-29,3 (chaînes) ; 27,6 ( $\text{CH}_2\text{S}$ ) ; 22,7 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ) ; 14,1 ( $\text{CH}_3$ ).

• Rac-2,3-di[*N*-(heptadécyl)carbamoyloxy-propyl]-3-mercapto propionamide (4)

20 2 g du composé 3 (2,03 mmol) et 0,236 g de triéthylsilane (2,03 mmol, 1 éq) sont solubilisés dans un minimum de dichlorométhane et refroidis à 0° C par un bain de glace. Une solution à 10 % d'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane est ajoutée, à froid, goutte à goutte, par l'intermédiaire d'une ampoule à brome. Dès la fin de l'addition, le milieu est ramené à température ambiante et laissé sous agitation durant 3 heures. Après évaporation à sec, reprise dans le dichlorométhane et lavages à l'eau distillée saturée en chlorure de sodium puis avec une solution saturée en bicarbonate de sodium, le brut est évaporé à sec et repris dans l'acétate d'éthyle où il cristallise à froid. Le produit pur est récupéré sous la forme d'une poudre blanche (1,3 g, Rdt : 86 %).

30 RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) 6,46 (1H, t, NH) ; 4,97-4,95 (3H, m,  $\text{CHO}$ ,  $\text{CH}_2\text{O}$ ) ; 4,21 (2H, m, NH) ; 3,50 (2H, t,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ) ; 3,16 (4H, q,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ) ; 2,81 (2H, q,  $\text{CH}_2\text{S}$ ) ; 2,51 (2H, t,  $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ) ; 1,64 (1H, t, SH) ; 1,50 (4H, m,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2$ ) ; 1,27 (54H, m,  $\text{CH}_2$  chaînes) ; 0,89 (6H, t,  $\text{CH}_3$ ).

35 RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) 170,9 ( $\text{CH}_2\text{CONH}$ ) ; 156,1-156,0 ( $\text{OCONH}$ ) ; 71,3 ( $\text{CHO}$ ) ; 63,5 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ) ; 41,2 ( $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ) ; 40,4 ( $\text{NHCH}_2\text{CH}$ ) ; 35,5 ( $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ) ; 31,9 ( $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ) ; 29,9-29,4 (chaînes) ; 22,7 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ) ; 20,4 ( $\text{CH}_2\text{S}$ ) ; 14,1 ( $\text{CH}_3$ ).

• Composé A1 acétylé

0,5 g de composé 4 (0,67 mmol) et 1,01 g de THAM triacétylé (3,37 mmol, 5 éq) sont solubilisés dans 30 mL de triéthylamine fraîchement distillée. Le mélange est porté à 50°C sous bullage d'Argon durant 2 heures puis ramené à température ambiante et évaporé à sec. Le brut est repris dans l'acétate d'éthyle pour être lavé avec une solution aqueuse normale d'acide chlorhydrique puis avec une solution aqueuse saturée en bicarbonate de sodium. Le produit est ensuite purifié par chromatographie sur gel de silice sur colonne éluée à l'acétate d'éthyle pur. Après évaporation et séchage, le produit est obtenu pur sous la forme d'une poudre blanche (0,33 g, Rdt : 46 %).

RMN  $^1\text{H}/(\text{CDCl}_3)$  :  $\delta$  (ppm) 6,48 (1H, t,  $\text{CONHCH}_2$ ) ; 6,37 (1H, s,  $\text{CONHC}$ ) ; 5,05-4,96 (3H, m,  $\text{CHO}$ ,  $\text{CH}_2\text{O}$ ) ; 4,45 (6H, s,  $\text{CH}_2\text{O}$ ) ; 4,22 (2H, m,  $\text{NH}$ ) ; 3,48 (2H, t,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ) ; 3,17 (4H, q,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ) ; 2,81 (2H, q,  $\text{CH}_2\text{S}$ ) ; 2,49 (4H, t,  $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ) ; 2,10 (9H, s,  $\text{CH}_3$ ) ; 1,44 (4H, m,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2$ ) ; 1,27 (54H, m,  $\text{CH}_2$  chaînes) ; 0,90 (6H, t,  $\text{CH}_3$ ).

RMN  $^{13}\text{C}/(\text{CDCl}_3)$  :  $\delta$  (ppm) 171,7-171,5 ( $\text{CH}_2\text{CONH}$ ) ; 170,6 ( $\text{OCO}$ ) ; 156,2-156,0 ( $\text{OCONH}$ ) ; 71,2 ( $\text{CHO}$ ) ; 63,6 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ) ; 62,5 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ) ; 41,2 ( $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ) ; 40,2 ( $\text{NHCH}_2\text{CH}$ ) ; 37,1-36,6 ( $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ) ; 31,9 ( $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ) ; 29,8-29,3 (chaînes) ; 26,8 ( $\text{CH}_3$ ) ; 22,6 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ) ; 20,8 ( $\text{CH}_2\text{S}$ ) ; 14,1 ( $\text{CH}_3$ ).

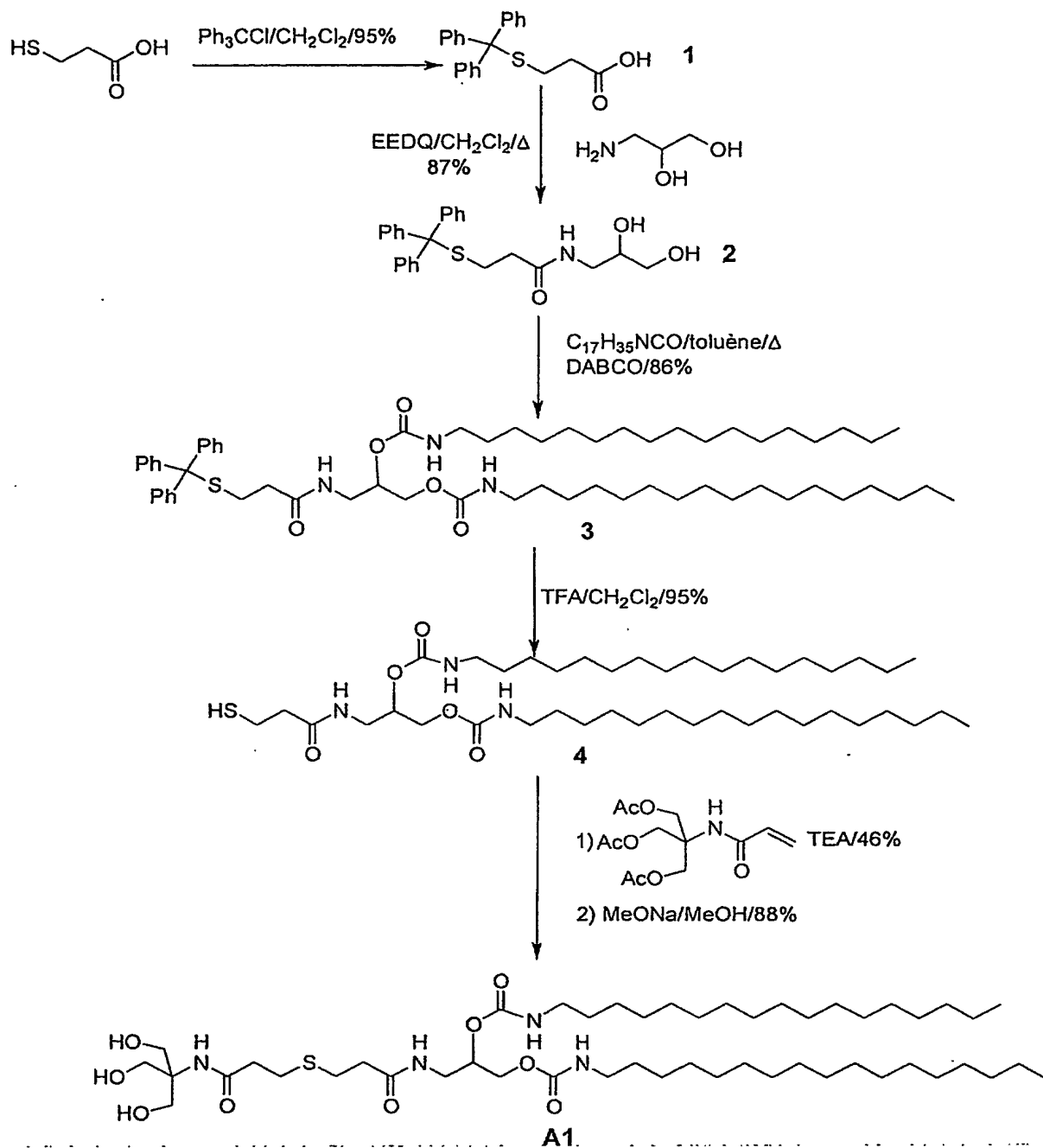


Schéma 1 : synthèse du dérivé A1

5

- Composé A1

0,3 g de dérivé acétylé (0,28 mmol) sont solubilisés dans un minimum de méthanol puis une pointe de spatule de méthylate de sodium (cat.) est ajoutée. Le mélange est laissé sous agitation à température ambiante durant 30 minutes en maintenant le pH entre 8 et 9 par ajout de méthylate de sodium si nécessaire. Le milieu réactionnel est ensuite neutralisé par ajout de quelques gouttes d'une solution aqueuse normale d'acide

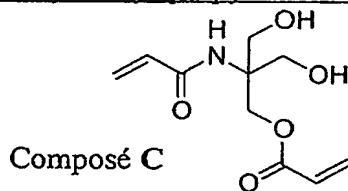
10

chlorhydrique. Après évaporation à sec, le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur gel de silice éluée avec un mélange acétate d'éthyle/méthanol 95:5 (v:v). Le produit est obtenu pur sous la forme d'une poudre blanche (0,233 g, Rdt : 88 %). Pf : 129 °C.

5 RMN  $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) 7,00 (1H, s,  $\text{CONH}\underline{\text{C}}$ ) ; 6,72 (1H, t,  $\text{CONH}\underline{\text{C}}\text{H}_2$ ) ; 5,00 (3H, m,  $\underline{\text{C}}\text{HO}$ ,  $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{O}$ ) ; 4,47 (3H, m, OH x3) ; 4,44 (6H, s,  $\text{CH}_2\text{O}$  x3) ; 4,19 (2H, m,  $\text{NH}$  x2) ; 3,48 (2H, t,  $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{NH}$ ) ; 3,16 (4H, q,  $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{NH}$  x2) ; 2,85 (2H, q,  $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{S}$ ) ; 2,65-2,50 (4H, t,  $\text{SCH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CO}$  x2) ; 1,44 (4H, m,  $\text{NHCH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2$  x2) ; 1,28 (54H, m,  $\text{CH}_2$  chaînes) ; 0,91 (6H, t,  $\text{CH}_3$  x2).

10 RMN  $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) 171,1 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_2\underline{\text{C}}\text{ONH}$ ) ; 156,2-156,0 ( $\text{O}\underline{\text{C}}\text{ONH}$ ) ; 71,2 ( $\text{CHO}$ ) ; 63,6 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{O}$ ) ; 61,0 ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ) ; 41,2 ( $\text{N}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2$ ) ; 40,2 ( $\text{NH}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}$ ) ; 37,1-36,6 ( $\text{SCH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CO}$ ) ; 31,9 ( $\text{NCH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2$ ) ; 29,9-29,3 (chaînes) ; 22,6 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_3$ ) ; 20,41 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{S}$ ) ; 14,1 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ).

**Exemple 2 : Synthèse de l'agent de réticulation C : l'acide 2-acryloylamino-3-hydroxy-2-hydroxyméthyl-propyl ester acrylique**



- Acide 5-acryloylamino-2,2-diméthyl-[1,3]-dioxan-5-yl méthyl ester acrylique

1g (4,65 mmol) de THAM isopropylidène est solubilisé dans un minimum de dichlorométhane. Le pH est ajusté et maintenu à 9 par ajout de quelques gouttes de triéthylamine puis une solution contenant 0,378 mL de chlorure d'acryloyle (4,65 mmol, 1 éq.) dans 4 mL de dichlorométhane est additionnée goutte à goutte. La réaction est suivie en CCM (acétate d'éthyle/ cyclohexane 7:3) avec la disparition du THAM isopropylidène ( $R_f$  : 0,3). Le milieu est ensuite neutralisé par ajout d'acide formique, évaporé à sec et purifié par chromatographie sur gel de silice à l'aide d'un gradient d'élution acétate d'éthyle/cyclohexane 7:3 à 5:5. Le produit pur est obtenu sous la forme d'une huile jaune (1,1 g, Rdt : 87 %).

30 RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) 6,50 (m, 1H,  $\underline{\text{C}}\text{HCONH}$ ), 6.43 (d, 1H,  $\underline{\text{C}}\text{H}_{2b}$  ester acrylique), 6.30 (s, 1H,  $\text{NH}$ ), 6.22 (d, 1H,  $\underline{\text{C}}\text{H}_{2b}$  acrylamide), 6.14 (d, 1H,  $\underline{\text{C}}\text{HCOO}$ ), 5.93 (d, 1H,  $\underline{\text{C}}\text{H}_{2a}$  ester acrylique), 5.65 (d, 1H,  $\underline{\text{C}}\text{H}_{2a}$  acrylamide), 4.62 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{OCO}$ ), 4.42 (d, 2H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.80 (d, 2H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 1.49 (d, 6H,  $\text{CH}_3$ x2)

RMN  $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm)

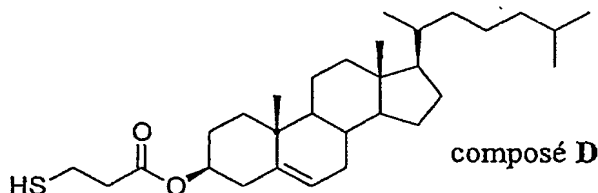
• Acide 2-acryloylamino-3-hydroxy-2-hydroxyméthyl-propyl ester acrylique

1,1 g (4,08 mmol) d'acide 5-acryloylamino-2,2-diméthyl-[1,3]-dioxan-5-yl méthyl ester acrylique et 5,45 g de Montmorillonite K10 sont mélangés dans du dichlorométhane et laissés sous agitation à température ambiante durant 4 jours. Ce mélange est ensuite filtré sur célite et lavé au méthanol. Le gâteau de célite est repris plusieurs fois dans le méthanol sous forte agitation avant d'être à nouveau filtré. Après évaporation à sec, le produit est obtenu pur sous la forme d'une huile jaune (0,766 g, Rdt : 82 %).

10 RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) 6.73 (s, 1H,  $\text{NH}$ ), 6.42 (d, 1H,  $\text{CH}_{2b}$  ester acrylique), 6.21 (d, 1H,  $\text{CH}_{2b}$  acrylamide), 6.14 (d, 1H,  $\text{CHCOO}$ ), 5.88 (d, 1H,  $\text{CH}_{2a}$  ester acrylique), 5.69 (d, 1H,  $\text{CH}_{2a}$  acrylamide), 4.70 (m, 2H,  $\text{OH}$  x2), 4.39 (d, 2H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.70 (dd, 4H,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm)

15 Exemple 3 : Synthèse du dérivé D, le 3-mercaptopropanoate de cholestéryle



• Acide 3-(tritylmercapto) propanoïque

20 17,34 g (62,3 mmol, 1,1 éq.) de chlorure de triphénylméthyle sont dissous dans un minimum de dichlorométhane et additionnés goutte à goutte à une solution contenant 6 g (56,6 mmol) d'acide 3-mercapto propanoïque dilué dans 30 mL de dichlorométhane. Le mélange est placé sous agitation à température ambiante durant 16 heures. Le produit cristallise directement dans le milieu réactionnel. Après filtration et lavage des cristaux à l'éther, le produit est obtenu pur sous la forme d'une poudre blanche (18,51 g, Rdt : 94 %). Pf : 203-204 °C.

RMN  $^1\text{H}$ (DMSO) :  $\delta$  (ppm) 7,3 (m, 15H, aromatiques trityle), 2,2 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{S}$ ,  $\text{CH}_2\text{CO}$ )

30 RMN  $^{13}\text{C}$ (DMSO) :  $\delta$  (ppm) 173 ( $\text{COOH}$ ), 144.2 et 126,4-129 (aromatiques du trityle), 66 ( $\text{Ph}_3\text{CS}$ ), 33 ( $\text{CH}_2\text{S}$ ), 26,5 ( $\text{CH}_2\text{CO}$ )

• 3-(tritylmercapto)propanoate de cholestéryle

5 g (14,3 mmol) d'acide mercaptopropanoïque tritylé, 1,74 g (14,3 mmol, 1 éq.) de N-diméthylaminopyridine et 3,57 g (17,16 mmol, 1,2 éq.) de



dicyclohexylcarbodiimide sont dissous dans 50 mL de dichlorométhane. 5,54 g (14,3 mmol, 1 éq.) de cholestérol sont additionnés au mélange à température ambiante. La disparition de l'acide permet de suivre le déroulement de la réaction en CCM (hexane/acétate d'éthyle 8:2). Au bout de 90 minutes, l'agitation est stoppée, le précipité  
 5 formé est filtré et lavé à l'éther. Le produit est obtenu pur sous la forme d'une poudre blanche après évaporation du filtrat et recristallisation dans un mélange éther/méthanol (10,12 g, Rdt : 97 %). Pf : 132 °C.  $[\alpha]_D^{20}$  : -14,9 (c, 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

RMN <sup>1</sup>H/(DMSO) : δ (ppm) 7,2 (m, 15H, aromatiques trityle), 5,3 (m, 1H, H<sub>a</sub> cholestérol), 4,5 (m, 1H, CH<sub>6</sub>OCO cholestérol), 2,35 (m, 2H, CH<sub>2</sub>S), 2,2 (m, 2H, CH<sub>2</sub>COO), 2,18 (m, 2H, CH<sub>e2</sub> cholestérol), 0,93 (m, 3H, CH<sub>d3</sub> cholestérol), 0,84 (m, 3H, CH<sub>e3</sub> cholestérol), 0,79 (m, 6H, CH<sub>f3</sub>, CH<sub>g3</sub> cholestérol), 0,60 (s, 3H, CH<sub>h3</sub> cholestérol).  
 10

RMN <sup>13</sup>C/(DMSO) : δ (ppm) 170,8 (CH<sub>2</sub>COO), 144,3 (C<sub>5</sub> cholestérol), 139,2 ; 126,2-129,2 (aromatiques du trityle), 122,9 (C<sub>6</sub> cholestérol), 74,5 (C<sub>3</sub> cholestérol), 64,2 (Ph<sub>3</sub>CS), 56,7 (C<sub>14</sub> cholestérol), 56,2-11,9 (pics caractéristiques du cholestérol).

15 • 3- Mercaptopropanoate de cholestéryle

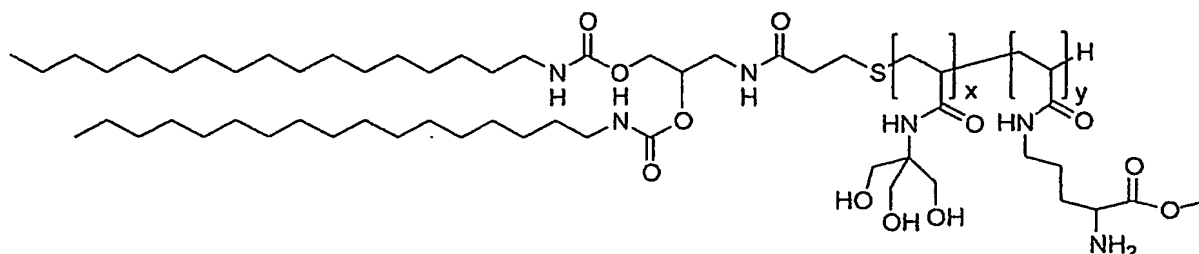
5 g (6,98 mmol) de 3-(*trityl*mercaptopropanoate de cholestéryle et 0,8 g (6,98 mmol, 1 éq.) de triéthylsilane sont dissous dans un minimum de dichlorométhane et refroidis à 0 °C par un bain de glace. 220 mL d'un mélange de dichlorométhane et d'acide trifluoroacétique (10:1 v:v) sont ajoutés goutte à goutte dans le milieu réactionnel. La  
 20 réaction est suivie en CCM (cyclohexane/acétate d'éthyle 9:1). En fin de réaction, le mélange est concentré sous vide à 40 °C. Le brut est repris dans l'éther avant d'être lavé avec une solution aqueuse normale de bicarbonate de sodium et recristallisé dans un mélange éther/méthanol. Le produit est obtenu pur sous la forme de cristaux blancs (3,15 g, Rdt : 95 %). Pf : 69-70 °C.  $[\alpha]_D^{20}$  : -20,5 (c, 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

25 RMN <sup>1</sup>H/(DMSO) : δ (ppm) 5,3 (m, 1H, H<sub>a</sub> cholesterol), 4,6 (m, 1H, CH<sub>6</sub>OCO cholesterol), 2,67 (m, 2H, CH<sub>2</sub>SH), 2,53 (m, 2H, CH<sub>2</sub>COO), 2,27 (d, 2H, CH<sub>e2</sub> cholestérol), 1,54 (tr., 1H, SH), 0,94 (m, 3H, CH<sub>d3</sub> cholestérol), 0,80 (m, 3H, CH<sub>e3</sub> cholestérol), 0,77 (m, 6H, CH<sub>f3</sub>, CH<sub>g3</sub> cholestérol), 0,60 (s, 3H, CH<sub>h3</sub> cholestérol).

30 RMN <sup>13</sup>C/(DMSO) : δ (ppm) 171,0 (CH<sub>2</sub>COO), 143,9 (C<sub>5</sub> cholestérol), 122,9 (C<sub>6</sub> cholestérol), 74,5 (C<sub>3</sub> cholestérol), 56,8 (C<sub>14</sub> cholestérol), 56,2-11,9 (pics caractéristiques du cholestérol)

#### Exemple 4 : Synthèse d'un télomère lipidique de ciblage E

Cette synthèse est illustrée par le schéma 2.

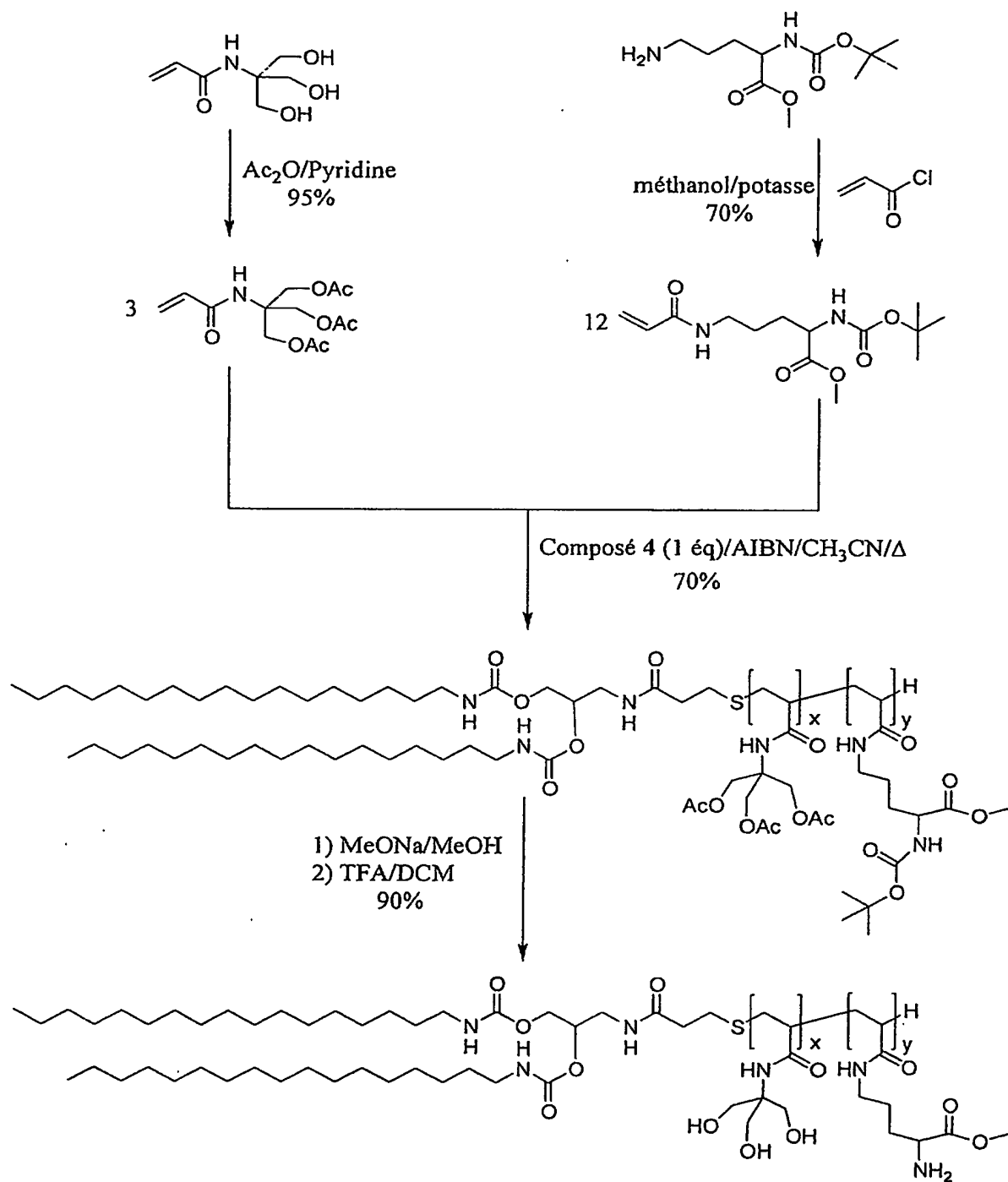


• Ester méthylique de l'acide 5-Acryloylamino-2-*tert*-butyloxycarbonylamino-pentanoïque (5)

4,00 g du sel d'acétate de la L-(Boc)LysOMe (12,50 mmol – 1 équiv.)  
 5 sont dissous dans 30 mL de dichlorométhane anhydre. Le pH de la solution est amené à 9 par addition de DIEA puis refroidi à 0°C. 1,87 mL de chlorure d'acryloyle (23 mmol – 1,85 équiv.) sont ajoutés goutte à goutte au mélange réactionnel en maintenant le pH de la solution basique par addition de DIEA. Après 24 heures d'agitation, le milieu est lavé à l'eau puis la phase organique est séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Les solvants sont évaporés sous  
 10 pression réduite et la purification par chromatographie flash sur gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/cyclohexane 8:2) permet d'obtenir le composé 5 (3,67 g, Rdt : 76 %) sous forme d'une huile incolore translucide.  $[\alpha]_D^{25} = +7,5$  (c, 1, CHCl<sub>3</sub>).

RMN <sup>1</sup>H (250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) : δ 8.08 (1H, t, J = 5.6 Hz, NH-CO-O), 7.22 (1H, d, J = 7.7 Hz, NH-CO), 6.20 (1H, dd, J<sub>cis</sub> = 9.7 Hz et J<sub>trans</sub> = 17.1 Hz, H<sub>c</sub>), 6.05  
 15 (1H, dd, J<sub>gem</sub> = 2.7 Hz et J<sub>trans</sub> = 17.1 Hz, H<sub>b</sub>), 5.56 (1H, dd, J<sub>gem</sub> = 2.7 Hz et J<sub>cis</sub> = 9.7 Hz, H<sub>a</sub>), 3.92 (1H, m, CH), 3.62 (3H, s, CH<sub>3</sub>-O), 3.10 (2H, q, J = 6.3 Hz, CH<sub>2</sub>-NH), 1.60 (6H, m, CH<sub>2</sub> de la lysine), 1.38 (9H, s, CH<sub>3</sub> du Boc).

RMN <sup>13</sup>C (62.86 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 169.3, 161.3 (CO), 136.8 (C<sup>IV</sup> arom), 130.7 (CH arom.), 128.6 (C<sup>IV</sup> arom), 128.6 (CH arom.), 125.5 (CH=N(O)), 72.2 (C<sup>IV</sup>), 28.4  
 20 (CH<sub>2</sub>-CO), 25.7 (CH<sub>3</sub> du *tert*-butyl).

Schéma de synthèse du télomère lipidique de ciblage **E**

- Tris-(acétoxyméthyl) acrylamidométhane (6)

100 mL d'un mélange anhydride acétique/pyridine 1 : 1 placé à froid (eau + glace) dans un ballon de 250 mL est agité pendant 10 minutes. Après ajout du Tris (hydroxyméthyl) acrylamidométhane (11,5 g, 66 mmol), le milieu réactionnel est ramené à température ambiante, puis laissé sous agitation durant 12h00. Le brut est versé dans 200 mL d'eau glacée et la phase aqueuse est extraite avec 200 mL de dichlorométhane. La phase organique est lavée avec une solution aqueuse d'HCl 1N (100 mL) puis une solution aqueuse de NaHCO<sub>3</sub> sat (100 mL), séchée sur sulfate de sodium puis concentrée sous pression réduite. Deux cristallisations successives dans un mélange AcOEt/hexane permettent d'obtenir le composé 6 sous la forme d'aiguilles blanches (17 g, 90 %). Pf : 96-97°C.

RMN <sup>1</sup>H (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 5.9-6.2 (1H, dd, CH<sub>2</sub>=CH ; 2H, 2dd, CH<sub>2</sub>=CH ; 1H, s, NH), 4.48 (6H, s, CH<sub>2</sub>-OAc), 2.09 (9H, s, CH<sub>3</sub>CO).

RMN <sup>13</sup>C (62.86 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 170.7 (CH<sub>3</sub>CO), 165.6 (NHCO), 130.9 (CH<sub>2</sub>=CH), 127.1 (CH<sub>2</sub>=CH), 62.7 (CH<sub>2</sub>O), 58.2 (C-NH), 20.7 (CH<sub>3</sub>CO).

- Synthèse du lipide télomérisé E

Dans un ballon bicol de 100 mL surmonté d'un réfrigérant, sont dissous 0,767 g de monomère 6 (2,55 mmol, 12 éq) et 0,2 g de monomère 5 (0,63 mmol, 3 éq) dans 20 mL d'acétonitrile fraîchement distillé. Le milieu réactionnel est dégazé sous argon et porté à reflux. 7 mg d'AIBN (4,29.10<sup>-2</sup> mmol, 0,2 éq) et 0,157 g de thiol 4 (0,21 mmol, 1 éq) dissous dans 5 mL d'acétonitrile fraîchement distillé et dégazé sont additionnés. La réaction est maintenue au reflux pendant 4h jusqu'à consommation totale des monomères (détectée par CCM). Le milieu réactionnel est concentré sous pression réduite et le brut réactionnel est filtré sur colonne sephadex (MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1 : 1). Le produit est ensuite dissous dans 100 mL de méthanol en présence d'une quantité catalytique de méthylate de sodium. Après 5h d'agitation le milieu réactionnel est neutralisé par addition de résine acide IRC 50. La résine est éliminée par filtration et le solvant éliminé sous pression réduite. Le produit est ensuite mis en réaction à froid dans un mélange acide TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20%) pendant 3h.

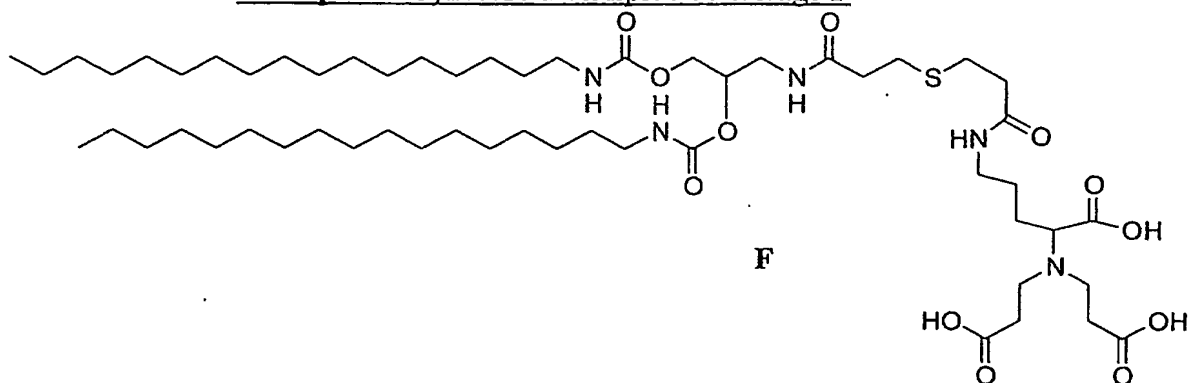
Le milieu réactionnel est concentré sous pression réduite. L'huile obtenue est reprise plusieurs fois dans de l'éther jusqu'à précipitation du télomère sous la forme d'une poudre blanche. Le produit est dissous dans l'eau et lyophilisé jusqu'à obtention du composé E sous la forme d'une poudre blanche.

Le degré de polymérisation moyen (DP<sub>n</sub>) et le rapport des concentration de chaque monomère dans la macromolécule (x et y) a été déterminé par RMN <sup>1</sup>H en comparant les intégrations des signaux des méthyles des deux chaînes alkyle à 1,1 ppm à

celle des signaux du Tris ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ) à 4,3 ppm et de la lysine ( $\text{CH}_2\text{NH}$ ) à 3,37 ppm. Nous avons pu déterminer les valeurs suivantes pour x et y :

x : 30 et y : 10

**Exemple 5 : Synthèse d'un lipide de ciblage F**



- Acide 5-Acryloylamino-2-tert-butoxycarbonylamino-pentanoïque 7

2 g de Boc Lysine (8,13 mmoles) sont dissous dans 10mL d'un mélange acétonitrile – soude 2N 1 : 1. Le milieu réactionnel est refroidi à 10°C. Le chlorure d'acryloyle (1,1 g, 12,19 mmoles) dissous dans 10 mL d'acétonitrile est additionné goutte à goutte. Le pH est maintenu à 8 par addition de soude 2N. A la fin de l'addition le milieu réactionnel est agité 2h à température ambiante puis acidifié avec une solution d'HCl 2N, extrait avec de l'acétate d'éthyle (3x20mL). La phase organique est séchée puis concentrée sous pression réduite. Le produit final est obtenu pur sous la forme d'une poudre blanche par recristallisation dans l'éthanol (1,9 g, 78%).

RMN  $^1\text{H}$  (250 MHz, DMSO- $d_6$ ) :  $\delta$  8.02 (1H, t, NH-CO-O), 7.18 (1H, d,  $J = 7.4$  Hz, NH-CO), 6.25 (1H, dd,  $J_{\text{cis}} = 9.4$  Hz et  $J_{\text{trans}} = 17.1$  Hz,  $\text{H}_c$ ), 6.05 (1H, dd,  $J_{\text{gem}} = 2.7$  Hz et  $J_{\text{trans}} = 17.1$  Hz,  $\text{H}_b$ ), 5.6 (1H, dd,  $J_{\text{gem}} = 2.7$  Hz et  $J_{\text{cis}} = 9.4$  Hz,  $\text{H}_a$ ), 3.92 (1H, m, CH), 3.10 (2H, q,  $J = 6.3$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-NH}$ ), 1.60 (6H, m,  $\text{CH}_2$  de la lysine), 1.38 (9H, s,  $\text{CH}_3$  du Boc).

RMN  $^{13}\text{C}$  (62.86 MHz, DMSO- $d_6$ ) :  $\delta$  169.3, 161.3 (CO), 155.8 (CO urethane), 130.7 ( $\text{CH}_2=$ ), 128.6 ( $-\text{CH}=$ ), 80.5 (C tBu), 53.7 (CH Lys), 40.3 (C $\epsilon$ Lys), 33.2 (C $\beta$ Lys), 29.8 (C $\delta$ Lys), 28.4 ( $\text{CH}_2\text{-CO}$ ), 25.7 ( $\text{CH}_3$  du *tert*-butyl).

- Acide 6-Acryloylamino-2-[bis-(2-carboxy-éthyl)-amino]-hexanoïque 8

Dans un ballon de 50 mL, 1,9 g de composé 7 (6,33 mmoles) sont dissous dans 20 mL d'un mélange acide trifluoroacétique – dichlorométhane 1 : 1. Après 2h d'agitation le solvant est évaporé sous pression réduite et l'huile obtenue est reprise plusieurs fois dans du chloroforme et évaporé jusqu'à obtention d'une poudre. Dans un ballon de 25 mL, 1,94 g d'acide bromoacétique (12,66 mmoles) sont dissous dans 7 mL de soude 2N. La solution est refroidie à 0°C dans un bain de glace et la poudre obtenue après

déprotection, dissoute dans 11 mL d'une solution aqueuse de soude 2N est additionnée goutte à goutte. Après 2h de réaction à température ambiante, une solution aqueuse d'HCl 2N est additionnée jusqu'à l'obtention d'un pH acide. Le produit précipite. Le précipité est filtré et essoré puis séché sous pression réduite. Le produit **8** est obtenu pur sous la forme d'une poudre blanche après recristallisation dans l'éthanol (1,6 g, 57%).

RMN  $^1\text{H}$  (250 MHz, DMSO- $d_6$ ) :  $\delta$  8.02 (1H, t, NH-CO-O), 7.18 (1H, d,  $J = 7.4$  Hz, NH-CO), 6.25 (1H, dd,  $J_{\text{cis}} = 9.4$  Hz et  $J_{\text{trans}} = 17.1$  Hz,  $\text{H}_c$ ), 6.05 (1H, dd,  $J_{\text{gem}} = 2.7$  Hz et  $J_{\text{trans}} = 17.1$  Hz,  $\text{H}_b$ ), 5.6 (1H, dd,  $J_{\text{gem}} = 2.7$  Hz et  $J_{\text{cis}} = 9.4$  Hz,  $\text{H}_a$ ), 3.5 (4H, s, N-CH $_2$ -COOH), 3.3 (1H, t,  $J = 7.1$  Hz, CH $_2$ -CH-N), 2.9 (2H, m, CH $_2$ NH), 1-1.5 (6H, m, CH $_2$ CH $_2$ CH $_2$ ).

RMN  $^{13}\text{C}$  (62.86 MHz, DMSO- $d_6$ ) :  $\delta$  174.8, 173.6 (COOH), 168.4 (CONH), 130.4 (CH $_2$ =), 128.2 (-CH=), 64.8 (CH Lys), 53.8 (N-CH $_2$ -COOH), 40.3 (C $\epsilon$ Lys), 30.5 (C $\beta$ Lys), 29.8 (C $\delta$ Lys).

#### • Synthèse du lipide F

2,56 g de composé **4** (3,6 mmol) et 1,6 g de composé **8** (3,6 mmol) sont solubilisés dans 30 mL de triéthylamine fraîchement distillée. Le mélange est porté à 50°C sous bullage d'Argon durant 2 heures puis ramené à température ambiante et évaporé à sec sous pression réduite. Le produit est obtenu pur sous la forme d'une poudre blanche après recristallisation successive dans l'acétate d'éthyle (2,29 g, Rdt : 55 %).

RMN  $^1\text{H}$  (250 MHz, DMSO- $d_6$ ) :  $\delta$  (ppm) 7.12 (1H, t, NH-CO-O), 6.48 (1H, t, CONHCH $_2$ ) ; 6.37 (1H, s, CONHC) ; 5.05-4.96 (3H, m, CHO, CH $_2$ O) ; 4.45 (6H, s, CH $_2$ O) ; 4.22 (2H, m, NH) ; 3.48 (6H, s + t, N-CH $_2$ -COOH, CH $_2$ NH) ; 3.25 (1H, t,  $J = 7.1$  Hz, CH $_2$ -CH-N), 3.17 (2H, m, CH $_2$ NH) ; 2.81 (4H, t, CH $_2$ S) ; 1.44 (4H, m, NHCH $_2$ CH $_2$ ) ; 1.27 (60H, m, CH $_2$  Lys, CH $_2$  chaînes) ; 0.90 (6H, t, CH $_3$ ).

RMN  $^{13}\text{C}$  (250 MHz, DMSO- $d_6$ ) :  $\delta$  (ppm) 171.7-171.5 (COOH, CH $_2$ CONH) ; 156.2-156.0 (OCONH) ; 71.2 (CHO) ; 64.5 (CH Lys), 63.6 (CH $_2$ O) ; 62.5 (CH $_2$ O) ; 53.2 (N-CH $_2$ -COOH), 41.2 (NCH $_2$ CH $_2$ ) ; 40.2, 40.1 (C $\epsilon$ Lys, NHCH $_2$ CH) ; 37.1-36.6 (SCH $_2$ CH $_2$ CO) ; 31.9 (C $\beta$ Lys) ; 29.8-29.3 (chaînes et C $\beta$ Lys) ; 26.8 (CH $_3$ ) ; 22.6 (CH $_2$ CH $_3$ ) ; 20.8 (CH $_2$ S) ; 14.1 (CH $_3$ ).

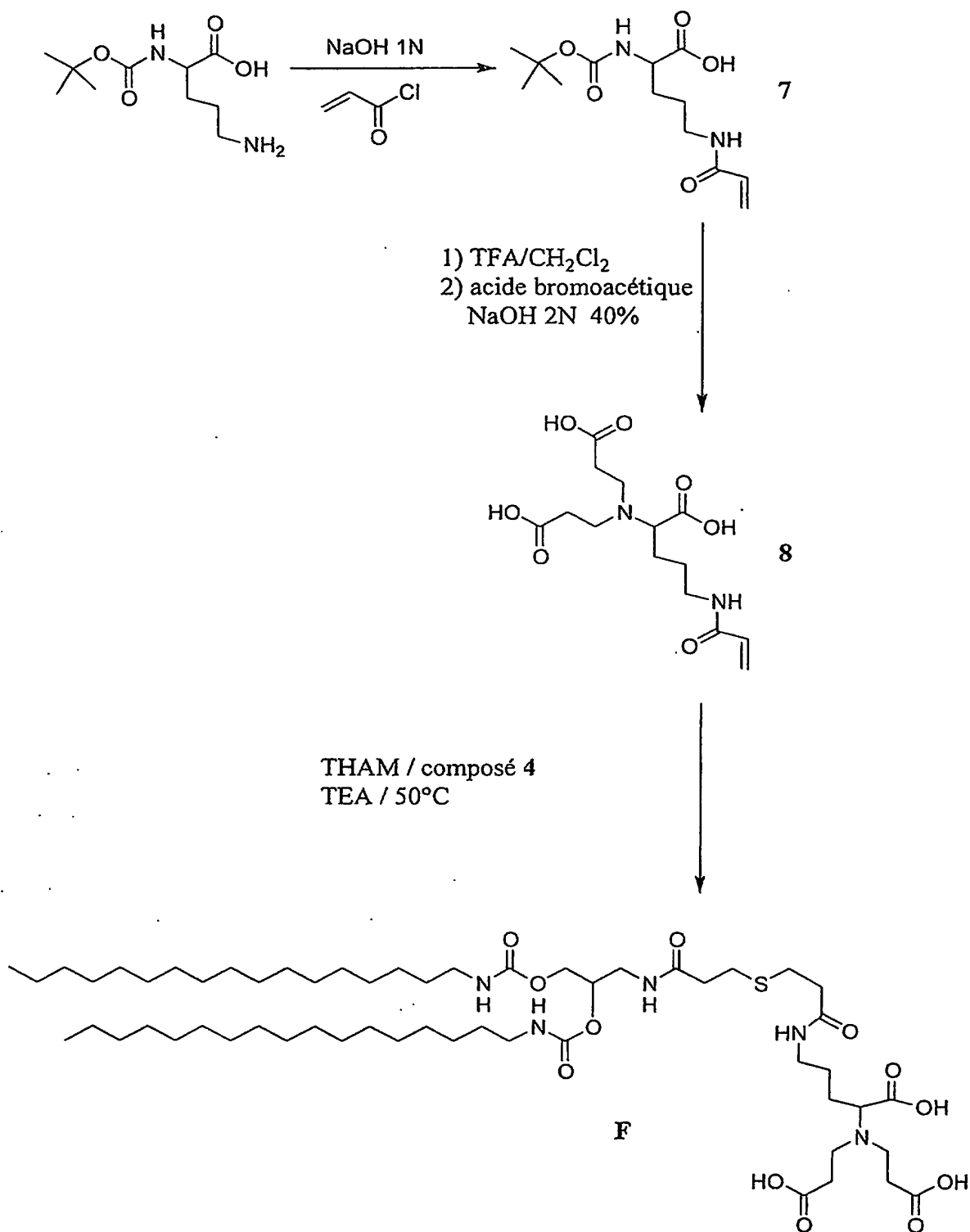


schéma de synthèse du lipide de ciblage **F**

**Exemple 6 : Préparation des vésicules tubulaires à partir du dérivé **A1****

Matériel utilisé.

- Mesure de la taille des vésicules tubulaires.

La distribution en taille des particules a été mesurée par spectroscopie de corrélation photonique de la lumière d'échantillon dilués dans l'eau en utilisant un appareil Malvern HPPS/NIBS équipé d'un laser He/Ne de 3 mW et d'un corrélateur à 288 canaux muni d'une avalanche de photodiodes. Le traitement mathématique de la courbe d'autocorrélation fait appel à la méthode Contin.

- Dispersion des lipides

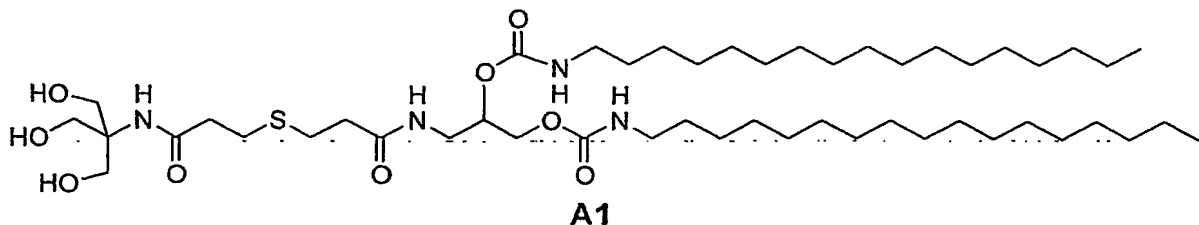
Les lipides A sont dispersés dans l'eau selon la méthode film dans un bain de sonication Bransonic thermostaté type 2510 E (100 W, 42 Hz) au dessus de leur température de transition de phase pendant une demi heure.

- Formation des dispersions de vésicule tubulaires

Les vésicules tubulaires sont préparées dans un premier temps en solubilisant le lipide A1 dans le chloroforme. La solution est concentrée lentement sous pression réduite dans un ballon forme cœur de 20 mL à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le film obtenu est ensuite séché sous pression réduite à l'aide d'une pompe à palette. Le film de lipide est réhydraté avec de l'eau distillé à 65 °C (10°C au dessus de la température de transition de phase du lipide) à une concentration de 2.5 mg.mL<sup>-1</sup>. Le mélange est homogénéisé au vortex pendant 5 minutes puis soumis aux ultrasons pendant 30 minutes à 70°C. La solution bleutée translucide obtenue est filtrée à travers un filtre de 0,45 µm puis analysée au spectromètre de corrélation photonique et en microscopie électronique par transmission (figures 3, 4 et 5).

Avec R=C<sub>17</sub>H<sub>35</sub> (dérivé A1). La température de transition de phase a été mesurée par détection de la polarisation d'une sonde fluorescente, le DPH en spectrofluorimétrie : T<sub>m</sub> = 54°C

Nous obtenons des vésicules tubulaires dont le diamètre hydrodynamique moyen mesuré par diffraction de la lumière est de 132 nm (IP : 0,35).



Les mesures de forme et de taille établies par observation des clichés de microscopie électronique (figures 4 et 5) ont permis de mettre en évidence la formation de vésicules tubulaires refermées à leurs extrémités dont la section moyenne est de 38 nm et la longueur moyenne de 247 nm. Les analyses en cryofracture ont confirmé la formation de



ces vésicules tubulaires et leurs caractéristiques morphologiques, à savoir la présence d'une cavité aqueuse interne isolée du milieu extérieur.

5 Ces vésicules tubulaires ont une stabilité élevée puisqu'on n'observe aucune évolution de la taille des particules après un an de stockage tandis que dans les mêmes conditions, des liposomes formés de phosphatidyl choline de jaune d'œuf évoluent au bout de seulement 5 jours.

10 La mise en évidence de la cavité interne aqueuse a été prouvée indirectement par des mesures spectrofluorimétriques de l'encapsulation et des cinétiques de libération d'une sonde fluorescente hydrophile, la carboxyfluorescéine (figure 1). Les mesures montrent clairement une cinétique de libération plus lente de la sonde fluorescente comparée à une encapsulation traditionnelle dans un mélange de phosphatidyl choline de jaune d'œuf.

15 **Exemple 7 : Encapsulation de carboxyfluorescéine dans des vésicules tubulaires fabriquées à partir du dérivé A1**

Le pouvoir d'encapsulation des différents composés est déterminé par spectrofluorimétrie à l'aide d'une sonde fluorescente : la 5 (6)-carboxyfluorescéine. On mesure la libération de ce marqueur fluorescent à partir des vésicules préparées selon les méthodes standardisées.

20 Cette étude nécessite la préparation d'un tampon Tris (15 mM et 150 mM NaCl) à pH 7,4, ainsi que d'une solution de carboxyfluorescéine à 120 mM et pH 7,4 également.

25 Les composés étudiés sont pesés (2,5 mg/mL) et sont dissous dans un minimum de méthanol. Le solvant est évaporé sous pression réduite au rotavapor et le film ainsi obtenu est séché par un flux d'azote.

On ajoute la solution de carboxyfluorescéine 120 mM dans le tampon Tris de manière à obtenir une dispersion de lipides de concentration égale à 2,5 mg/mL. La suspension obtenue est agitée au vortex pendant 1 minute puis soumise aux ultrasons dans un bain de sonication pendant 1 heure à 70°C.

30 La sonde fluorescente non encapsulée est éliminée par passage sur colonne Séphadex G25 préalablement équilibrée avec le tampon Tris. La fraction de vésicule récoltée est immédiatement étudiée par spectrofluorimétrie.

35 Les mesures de fluorescence ont été réalisées à l'aide d'un spectrofluorimètre Jobin-Yvon (spectrofluoromax 2), équipé d'une lampe Xénon 150 W. Toutes les mesures ont été effectuées dans une cuve en quartz, thermostatée à 25°C. Les échantillons ont été analysés à une longueur d'onde d'excitation de 480 nm, et une longueur d'onde d'émission de 530 nm pendant 4 heures.

Les bandes passantes ont été fixées à 0,5 nm aussi bien pour l'excitation que pour l'émission.

Pour chaque mesure, l'intensité de fluorescence initiale ( $F_0$ ) est déterminée 30 secondes après la filtration sur colonne. La libération est étudiée sur une période de 4h et l'intensité de fluorescence ( $F_t$ ) est mesurée à intervalle régulier. L'intensité maximum de fluorescence ( $F_{max}$ ) qui correspond à 100% de relargage, est obtenue après la lyse des vésicules tubulaires obtenue par ajout de Triton X100 (10% v/v).

Le pourcentage de libération est obtenu à l'aide de l'équation suivante (figure 1) :

$$\%R = (F_t - F_0) / F_{max}$$

**Exemple 8 : Polymérisation d'un monomère encapsulé dans des vésicules tubulaires obtenues à partir du lipide A1**

La composition des solutions utilisées est résumée dans le Tableau 1.

	Désignation	Solvant	Concentration
Monomère	THAM	Eau distillée	0,1 M
	Acrylamide	Eau distillée	0,1 M
Amorceur	tBuOOH / Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Dichlorométhane / Tampon	2,5.10 <sup>-4</sup> M / 2,5.10 <sup>-4</sup> M
	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Tampon	
Tampon	NaCl	Eau distillée	0,1 M

Tableau 1

- Préparation du film

20 mg de lipides A1 sont solubilisés dans 2 mL d'une solution d'hydropéroxyde de Cumène dans le dichlorométhane fraîchement distillé et dégazé par bullage d'argon (2,5.10<sup>-4</sup> M), dans un ballon forme cœur.

La solution est évaporée à sec à l'évaporateur rotatif (la température du bain ne dépassant pas 40°C) puis le film est séché à la pompe à palette (1 heure) et placé sous atmosphère inerte jusqu'à utilisation. Dans le cas d'un amorçage par le dithionite de sodium, le film est préparé dans du dichlorométhane fraîchement distillé et dégazé par bullage d'Argon.

- Dispersion

2 mL de solution de monomère dans l'eau distillée (0,1 M), préalablement désoxygénée par bullage d'Argon sont ajoutés. Le mélange est agité pendant 1 minute puis placé dans un bain d'ultrasons durant 60 minutes à 70 °C.

- Séparation - Polymérisation

La préparation est déposée sur colonne Sephadex G50 (2 cm de diamètre pour une hauteur de 10 cm de gel) préalablement équilibrée avec un tampon NaCl 0,1 M désoxygéné pendant 30 minutes par bullage d'Argon.

2 mL de fraction bleutée correspondant à une élution de 25 à 27 mL sont récupérés dans un ballon. 2 mL de solution de méta bisulfite de sodium dans le tampon NaCl ( $2,5 \cdot 10^{-4}$  M) sont alors ajoutés pour amorcer la polymérisation qui se déroule sous atmosphère inerte, à 37°C et durant 1 (acrylamide) à 3 heures (THAM).

Dans le cas d'un amorçage par le dithionite de sodium, 2 mL d'une solution de l'amorceur dans le tampon NaCl 0,1 M ( $2 \cdot 10^{-3}$  M) sont ajoutés après séparation sur colonne Sephadex.

**Exemple 9 : Télomérisation d'un monomère encapsulé dans des vésicules tubulaires obtenues à partir du lipide A1**

La composition des solutions utilisées est résumée dans le tableau 2.

	Désignation	Solvant	Concentration
Monomère	THAM	Eau distillée	0,1 M
Agent télogène	3-mercaptopropanoate de cholestéryle	Dichlorométhane	$2 \cdot 10^{-3}$ M
Amorceur	tBuOOH / Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Dichlorométhane / Tampon	$2,5 \cdot 10^{-4}$ M / $2,5 \cdot 10^{-4}$ M
	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Tampon	
Tampon	NaCl	Eau distillée	0,1 M

Tableau 2

- Préparation du film

18 mg de lipide A1 et 2 mg de composé télogène D sont solubilisés dans 2 mL d'une solution d'hydroperoxyde de Cumène dans le dichlorométhane fraîchement distillé et dégazé par bullage d'Argon ( $2,5 \cdot 10^{-4}$  M), dans un ballon cœur.

La solution est évaporée à sec à l'évaporateur rotatif (la température du bain ne dépassant pas 40°C) puis le film est séché à la pompe à palette (1 heure) et placé sous atmosphère inerte jusqu'à utilisation. Dans le cas d'un amorçage par le dithionite de sodium, le film est préparé dans du dichlorométhane fraîchement distillé et dégazé par bullage d'Argon.

- Dispersion

2 mL de solution de monomère dans l'eau distillée (0,1 M), préalablement désoxygénés par bullage d'Argon sont ajoutés. Le mélange est agité 1 minute puis placé dans un bain d'ultrasons durant 60 minutes à 70°C.

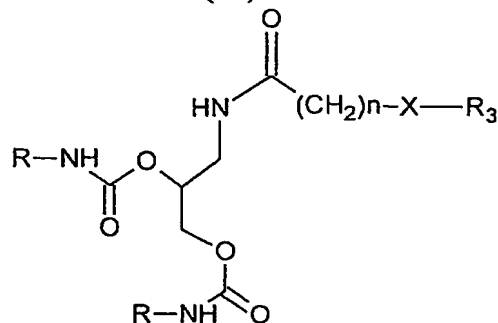
- Séparation - Polymérisation

La préparation est déposée sur colonne Sephadex G50 (2 cm de diamètre pour une hauteur de 10 cm de gel) préalablement équilibrée avec un tampon NaCl 0,1 M désoxygéné 30 minutes par bullage d'Argon.

- 5 2 mL de fraction bleutée correspondant à une élution de 25 à 27 mL sont récupérés dans un ballon. 2 mL de solution de métabisulfite de sodium dans le tampon NaCl ( $2,5 \cdot 10^{-4}$  M) sont alors ajoutés pour amorcer la télomérisation qui se déroule sous atmosphère inerte, à 37°C et durant 16 à 20 heures. Dans le cas d'un amorçage par le dithionite de sodium, 2 mL d'une solution de l'amorceur dans le tampon NaCl 0,1 M ( $2 \cdot 10^{-3}$  M) sont ajoutés après séparation sur colonne Sephadex.

# REVENDECATIONS

1. Composé de formule (III) :



(III)

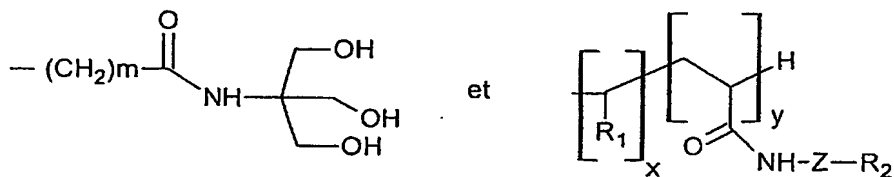
dans laquelle

- X représente un atome de soufre S ou un groupement  $-\text{CH}_2-$  ;

- n est un entier allant de 0 à 10 ;

- R représente un groupement choisi parmi : les radicaux hydrocarbonés en  $\text{C}_4$ - $\text{C}_{24}$  ; les radicaux hydrocarbonés fluorés en  $\text{C}_4$ - $\text{C}_{24}$  ; les radicaux thioalkyls en  $\text{C}_4$ - $\text{C}_{24}$  ;

-  $\text{R}_3$  représente un groupement choisi parmi :



dans lesquels

- m est un entier allant de 1 à 10 et lorsque  $\text{X}=\text{CH}_2$  alors  $1 < m+n < 7$  ;

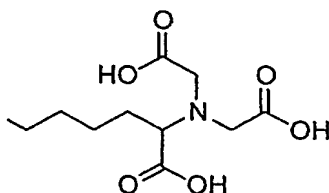
- x représente 0 ou un entier allant de 1 à 30 ;

- y représente 0 ou un entier allant de 1 à 10 ;

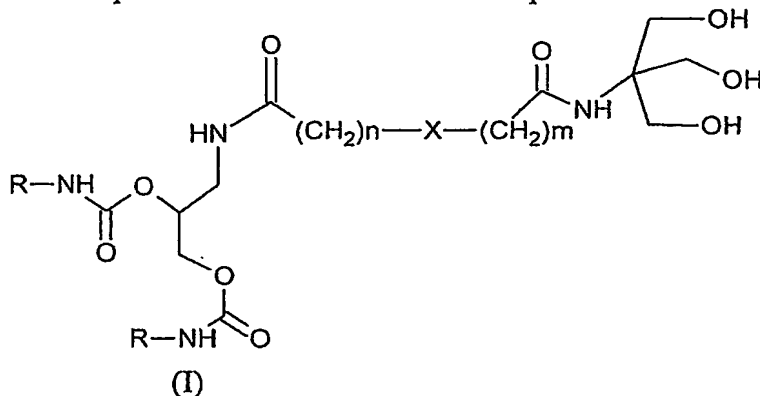
-  $\text{R}_1$  représente un groupement hydrophile ;

-  $\text{R}_2$  représente un groupement de reconnaissance ayant une affinité pour une cible biologique ;

- Z est un bras espaceur ; Z est lié à  $\text{R}_2$  au moyen d'une liaison qui peut être choisie parmi les fonctions  $-\text{O}-\text{CO}-$ ,  $-\text{CO}-\text{NH}-$ ,  $-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}-$ ,  $-\text{NH}-\text{CO}-\text{O}-$ ,  $\text{O}-\text{CO}-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-$ ,  $-\text{CH}=\text{N}-$ ,  $-\text{S}-$  ou par complexation d'un atome de nickel ; Z est choisi parmi une chaîne peptidique, un acide  $\Omega$ -aminé, l'éthanolamine, la 3-propanolamine, une diamine de formule  $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_p-\text{NH}-$  dans laquelle p représente un entier allant de 2 à 6, ou  $-\text{Z}-\text{R}_2$  représente un groupement NTA de formule suivante :



2. Composé selon la revendication 1 répondant à la formule (I) :



dans laquelle :

- $X$  représente un atome de soufre S ou un groupement  $-CH_2-$  ;
- $n$  est un entier allant de 0 à 10 ;
- $m$  est un entier allant de 1 à 10 ;
- lorsque  $X=CH_2$  alors  $1 < m+n < 7$  ;
- $R$  représente un groupement choisi parmi : les radicaux hydrocarbonés en  $C_4-C_{24}$  ; les radicaux hydrocarbonés fluorés en  $C_4-C_{24}$  ; les radicaux thioalkyls en  $C_4-C_{24}$ .

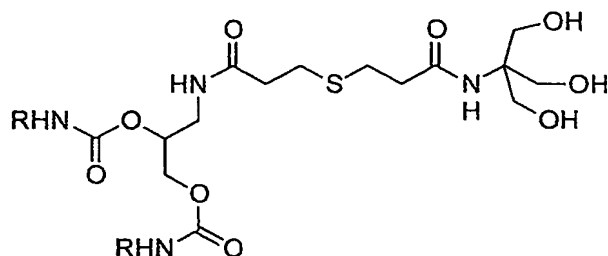
3. Composé selon la revendication 2, caractérisé en ce que le groupement  $R$  est choisi parmi les radicaux suivants :

- le radical thiooctyl
- le  $n$ -butyle, le  $ter$ -butyle, l'isobutyle, le  $n$ -pentyle, l'isopentyle, le  $n$ -hexyle, le  $n$ -heptyle, le  $n$ -octyle, le  $n$ -nonyle, le  $n$ -décyle, le  $n$ -undécyle, le  $n$ -dodécyle, le  $n$ -tridécyle, le  $n$ -tétradécyle, le  $n$ -pentadécyle, le  $n$ -hexadécyl, le  $n$ -heptadécyle, le  $n$ -octadécyle, le radical phytyl ( $CH_3[CH(CH_3)(CH_2)_3]CH(CH_3)CH_2CH_2$ ),
- les radicaux hydrocarbonés fluorés répondant à la formule  $-(CH_2)_t-(CF_2)_rF$ , dans laquelle  $r$  et  $t$  représentent deux entiers avec :  $14 \geq r+t \geq 4$ .

4. Composé selon la revendication 2 ou la revendication 3, caractérisé en ce que  $R$  est choisi de façon à ce que (I) ait une température de transition de phase supérieure à  $37^\circ C$ .

5. Composé selon l'une quelconque des revendication 2 à 4, caractérisé en ce que l'une ou plusieurs des conditions suivantes sont vérifiées :  $X=S$  ;  $n=2$  ;  $m=2$ .

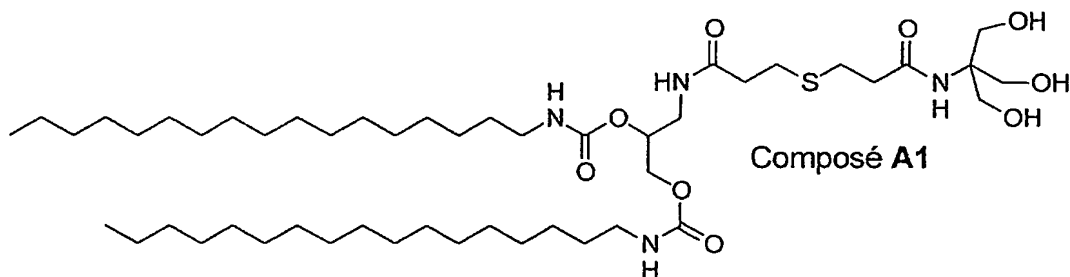
6. Composé selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il répond à la formule A :



5

Formule A

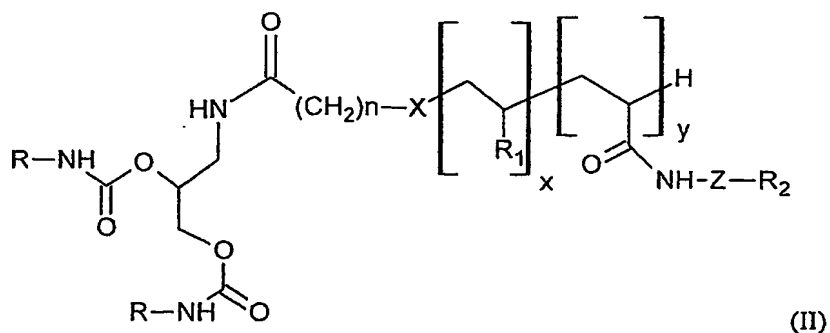
7. Composé selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il répond à la formule A1 :



Composé A1

10

8. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il répond à la formule (II) :



(II)

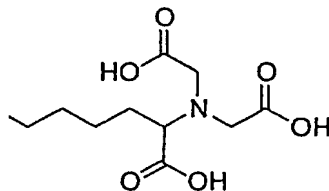
15

dans laquelle :

- X représente un atome de soufre S ou un groupement  $-CH_2-$  ;
- n est un entier allant de 0 à 10 ;
- x représente 0 ou un entier allant de 1 à 30 ;
- y représente 0 ou un entier allant de 1 à 10 ;
- $R_1$  représente un groupement hydrophile ;
- $R_2$  représente un groupement de reconnaissance ayant une affinité pour une cible biologique ;

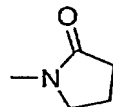
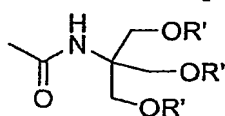
20

- Z est un bras espaceur ; Z est lié à R<sub>2</sub> au moyen d'une liaison qui peut être choisie parmi les fonctions -O-CO-, -CO-NH-, -NH-CO-NH-, -NH-CO-O-, O-CO-O-, -O-, -CH=N-, -S- ou par complexation d'un atome de nickel ; Z est choisi parmi une chaîne peptidique, un acide  $\Omega$ -aminé, l'éthanolamine, la 3-propanolamine, une diamine de formule -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-NH- dans laquelle p représente un entier allant de 2 à 6, ou -Z-R<sub>2</sub> représente un groupement NTA de formule :



9. Composé selon la revendication 8, caractérisé en ce que l'une ou plusieurs des conditions suivantes sont vérifiées :

- X=S
- n=2
- R<sub>1</sub> est choisi parmi les radicaux suivants :



- dans lesquels R' représente H ou un composé hydrocarboné polyhydroxylé en C<sub>4</sub>-C<sub>24</sub>,

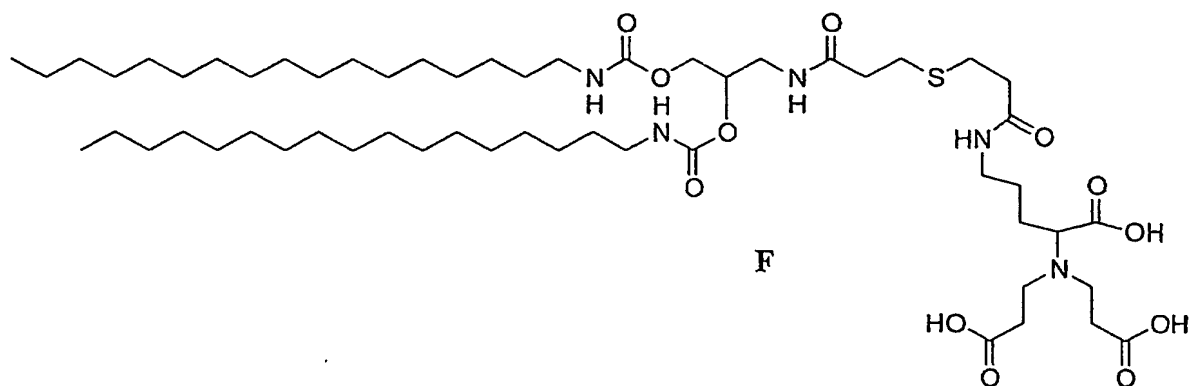
- R est choisi parmi les radicaux suivants :

- le radical thiooctyl,
- le n-butyle, le ter-butyle, l'isobutyle, le n-pentyle, l'isopentyle, le n-hexyle, le n-heptyle, le n-octyle, le n-nonyle, le n-décyle, le n-undécyle, le n-dodécyle, le n-tridécyle, le n-tétradécyle, radical phytyle (CH<sub>3</sub>[CH(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>]<sub>3</sub>CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>),
- les radicaux hydrocarbonés fluorés répondant à la formule - (CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>-(CF<sub>2</sub>)<sub>r</sub>F, dans laquelle r et t représentent deux entiers avec : 14 ≥ r+t ≥ 4.

- R<sub>2</sub> est choisi parmi des anticorps, des fragments d'anticorps, des petites molécules effectrices permettant l'interaction avec des récepteurs de surface cellulaires, des antigènes, des sucres, des peptides.

10. Composé selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il répond à la formule F :





Formule F

11. Procédé de préparation de liposomes caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

- Dissolution d'un composé de formule (I) selon l'une quelconque des revendications 2 à 7, dans un alcool ou dans un solvant chloré ;
- Evaporation du solvant ;
- Addition d'eau à une température allant de 40 à 80°C à une concentration allant de 0,5 à 10 mg/ml ;

- Traitement :
  - soit aux ultrasons à une température supérieure à la température de transition de phase du composé (I)
  - soit par extrusion de la solution à travers un ou plusieurs filtres de porosité appropriée,

jusqu'à l'obtention d'une solution translucide bleutée.

12. Liposome caractérisé en ce qu'il comporte un ou plusieurs composés de formule (I) selon l'une quelconque des revendications 2 à 7 comme constituant de ses parois.

13. Liposome selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'il est de forme allongée, refermé à ses extrémités, de section moyenne comprise entre 20 et 80 nm et de longueur moyenne comprise entre 200 et 500 nm.

14. Liposome selon la revendication 12 ou la revendication 13, caractérisé en ce qu'il comporte en outre de 1 à 5% d'un ou plusieurs composés de formule (II) selon l'une quelconque des revendications 8 à 10.

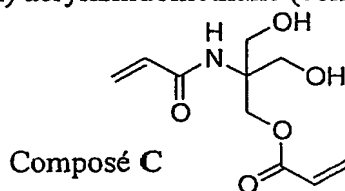
15. Liposome selon l'une quelconque des revendications 12 à 14, caractérisé en ce qu'il comporte en outre un télomère ou polymère d'un monomère de type acrylique contenu dans sa cavité aqueuse interne.

16. Liposome selon la revendication 15, caractérisé en ce que l'oligomère ou le polymère est constitué de blocs de construction monomériques, hydrophiles, ioniques ou non ioniques, choisis parmi les dérivés acide acrylique, acide méthacrylique,

méthacrylamide, ainsi que les dérivés acrylate, méthacrylate, acrylamide et méthacrylamide d'alcools en C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, de polyols en C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, de sucres et d'acides aminés.

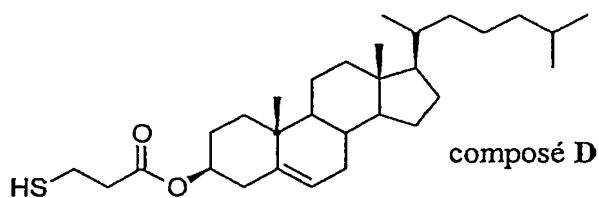
17. Liposome selon la revendication 15 ou la revendication 16, caractérisé en ce que le polymère est constitué de monomères choisis parmi : le  
5 tris(hydroxyméthyl)acrylamidométhane, l'acrylate de sodium, l'hydroxyéthyl acrylate, le glucose monoacrylate, le glucose-1-(N-méthyl)acrylamide, le glucose 2-acrylamide, le maltose 1-acrylamide, le monoacrylate de sorbitol.

18. Liposome selon l'une quelconque des revendications 15 à 17, caractérisé en ce que le polymère est réticulé par un agent réticulant choisi parmi : le  
10 glucose-1,2-diacrylamide, le sorbitol diacrylate, le saccharose diacrylate, le saccharose di(éthylènediamine acrylamide), le kanamycin tétracrylamide, le kanamycin diacrylamide, l'acrylate de tris(hydroxyméthyl) acrylamidométhane (composé C):

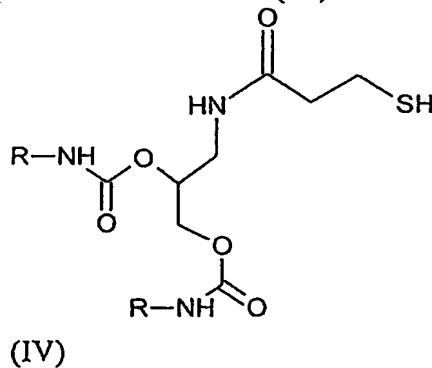


le réticulant étant présent en quantité allant de 1 à 5% en poids par  
15 rapport au poids du ou des monomères.

19. Liposome selon l'une quelconque des revendications 15 à 18, caractérisé en ce que le polymère comporte un ou plusieurs agents de transfert sélectionnés parmi : l'acide thiol acétique, l'acide mercaptopropionique, le thioéthylène glycol, la  
20 cystamine, la cystéine, les alcane thiols de C<sub>2</sub> à C<sub>30</sub>, le composé D



le phosphite de diéthyle, les phosphites de dioctyle, didodécyle, dihexadécyle, le composé répondant à la formule (IV) :



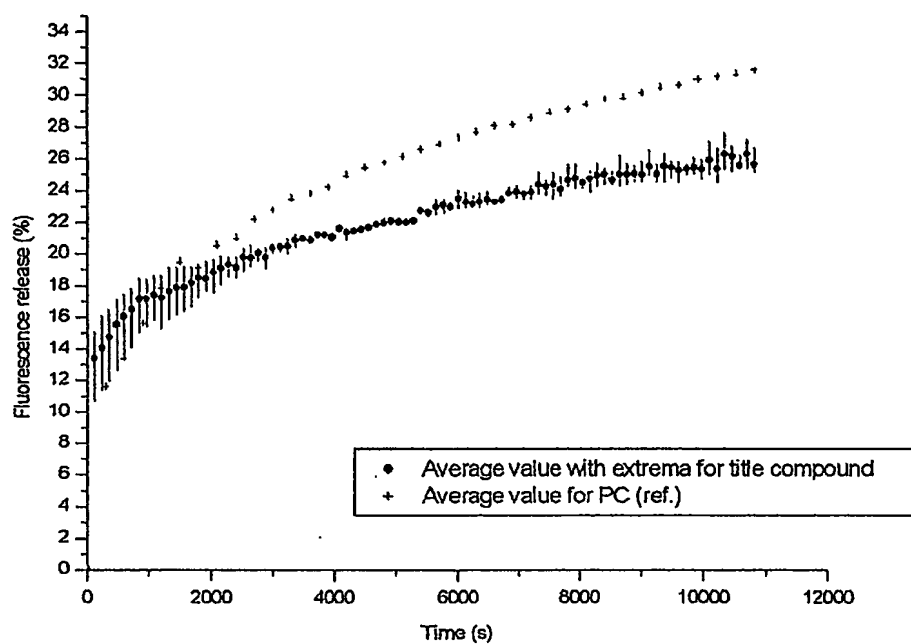
dans laquelle R a la même signification que dans les formules (I) (II) et (III).

20. Liposome selon la revendication 19 comportant un agent télogène de formule (IV).

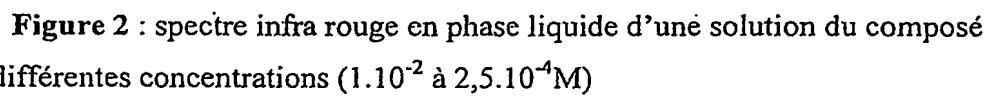
5 21. Liposome selon la revendication 19 ou la revendication 20, caractérisé en ce que le rapport agent de transfert de chaîne / tensioactif lipidique (I) varie de 1 à 10% en poids/poids et le rapport agent de transfert de chaîne / monomère varie de 0,1 à 10 % en poids/poids.

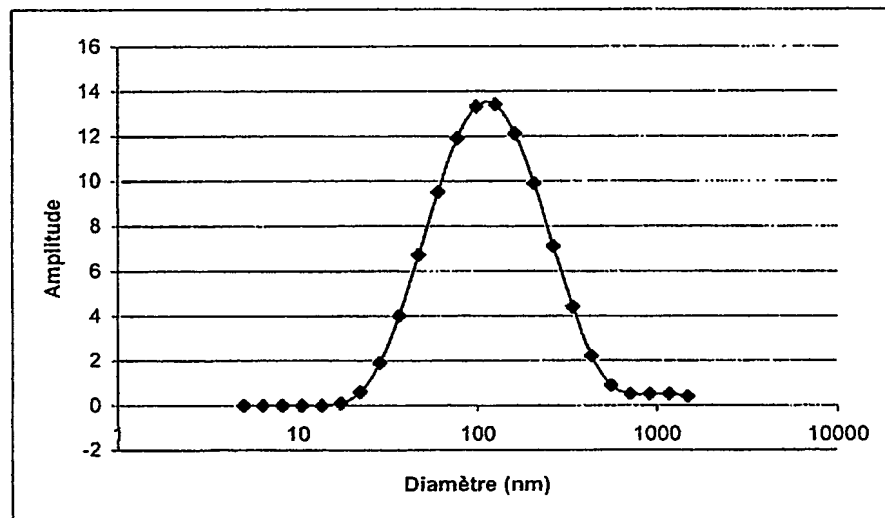
10 22. Association d'un liposome selon l'une quelconque des revendications 12 à 21 avec un composé choisi parmi : les principes actifs thérapeutiques, les substances cosmétiques, les agents de diagnostic.

15 23. Composition thérapeutique, de diagnostic ou cosmétique comprenant au moins un principe actif en association avec un liposome selon l'une quelconque des revendications 12 à 21.

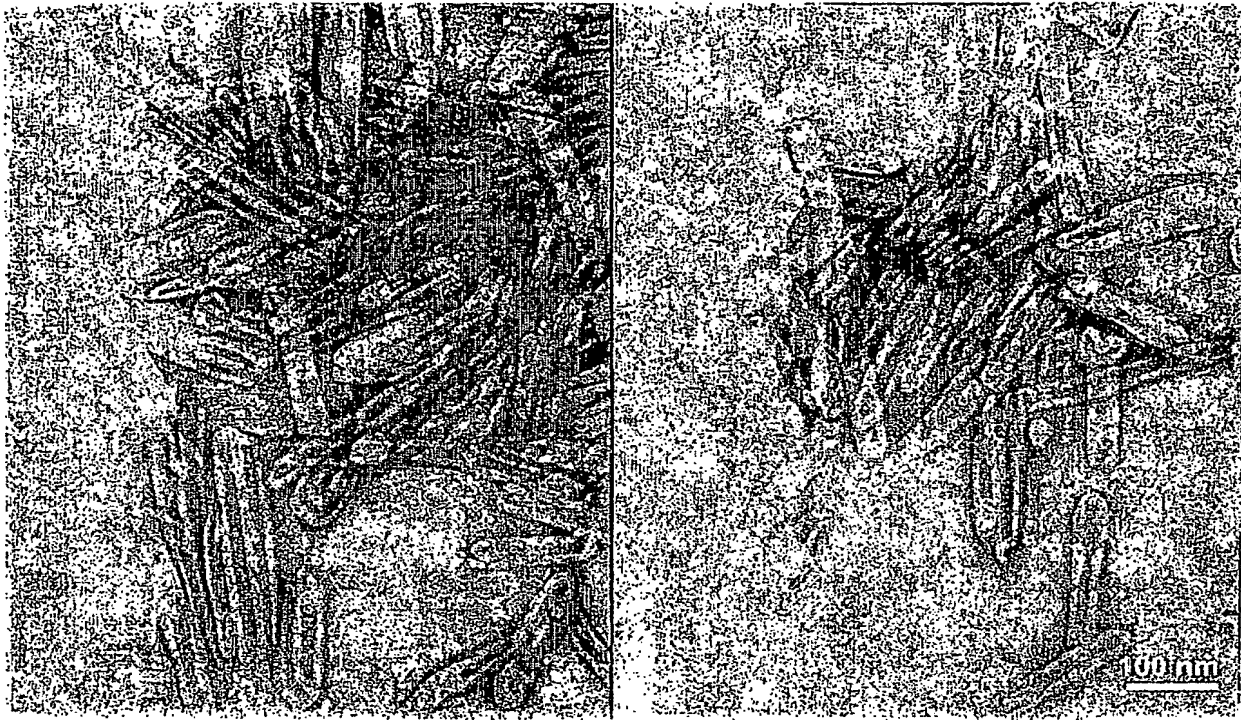


**Figure 1** : cinétique de relargage de la carboxyfluorescéine encapsulée dans des liposomes de phosphatidyl choline (+) et des nanotubes constitués du composé A1 (●), mesurée en spectrofluorimétrie.

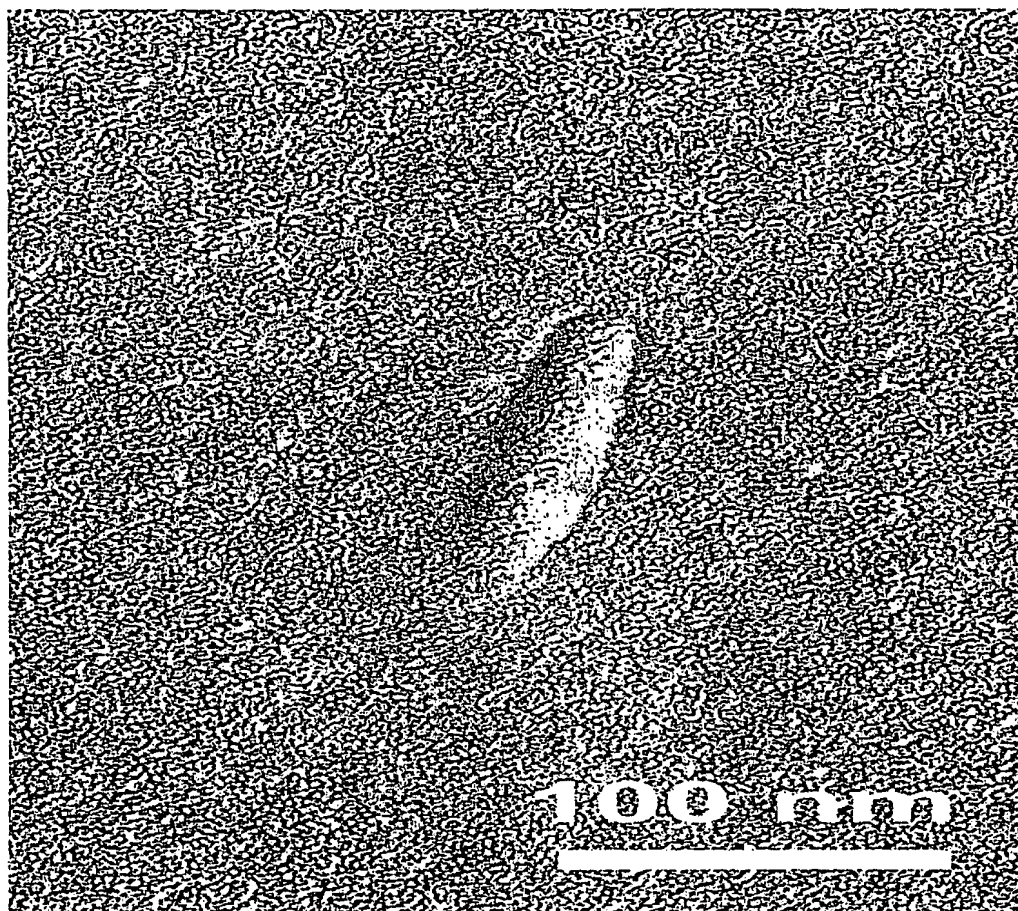




**Figure 3 :** courbe de distribution en taille par volume

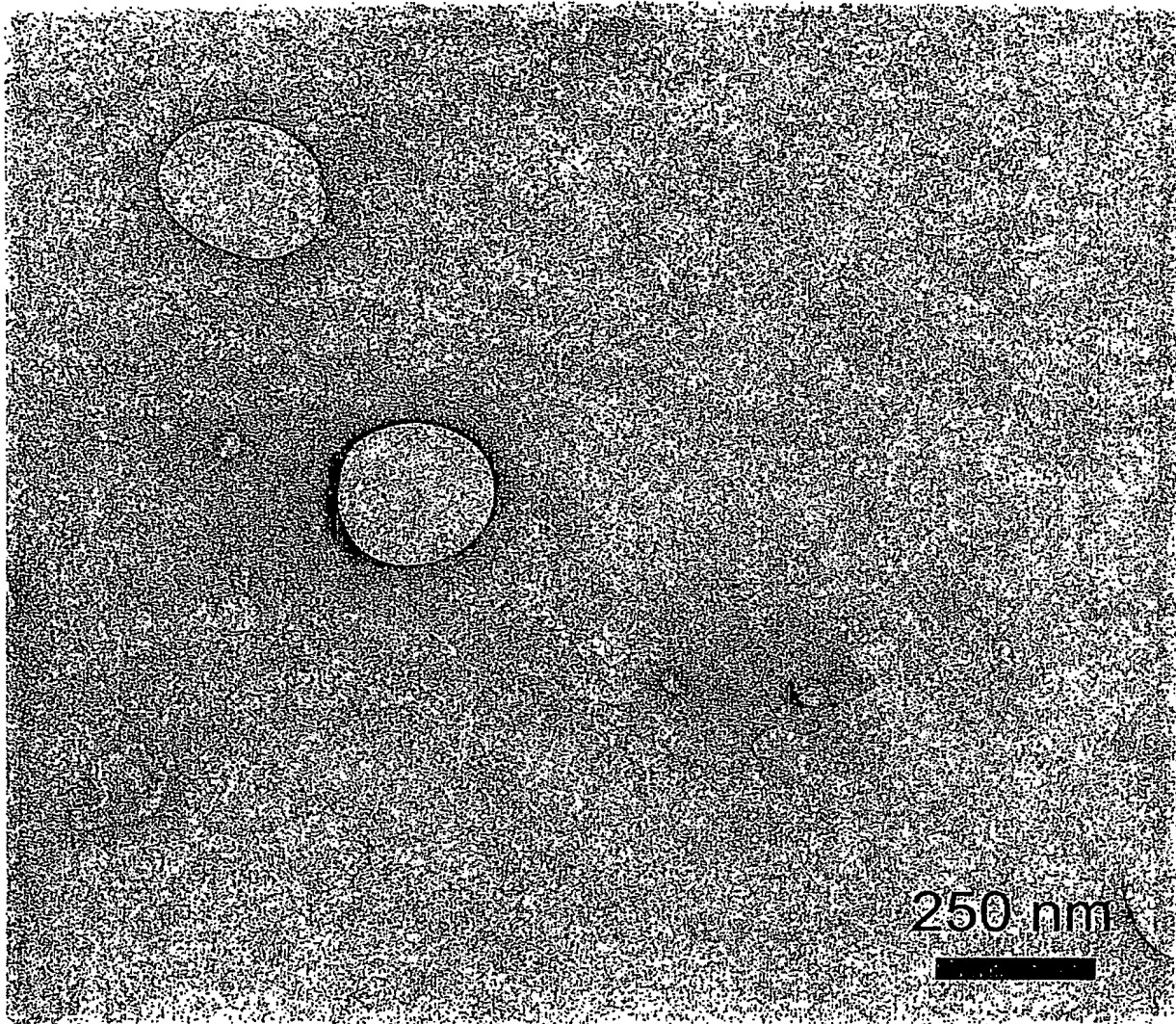


**Figure 4 :** Microscopie électronique par transmission de phase après coloration négative à l'acétate d'uranyle 2% de nanotubes formés par dispersion du composé A1 ( $2,5 \text{ mg.ml}^{-1}$ ) dans l'eau



**Figure 5 :** Microscopie électronique par transmission de phase après cryofracture d'un échantillon de nanotubes formés par dispersion du composé A1 ( $2,5 \text{ mg.ml}^{-1}$ ) dans l'eau





**Figure 6 :** Microscopie électronique par transmission de phase après coloration négative à l'acétate d'uranyle 2% d'un échantillon de nanotubes formés par dispersion du composé de structure B ( $2,5 \text{ mg.ml}^{-1}$ ) dans l'eau

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

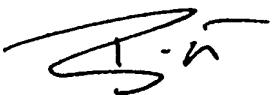
**DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S)** Page N° 1../2..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

**INV**

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DS 113 @ W / 270601

<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b>		VCstsF1578/3FR
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		0312390
<b>TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)</b>		
NOUVEAUX TENSIO-ACTIFS ET LEURS APPLICATIONS		
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b>		
TS PHARMA		
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b>		
<b>1</b>	<b>Nom</b>	PUCCI
	<b>Prénoms</b>	Bernard
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	12 Avenue des Alpilles
	<b>Code postal et ville</b>	1319401 MOLLEGES
<b>Société d'appartenance (facultatif)</b>		
<b>2</b>	<b>Nom</b>	POLIDORI
	<b>Prénoms</b>	Ange
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	16d, Avenue de la Synagogue
	<b>Code postal et ville</b>	840001 AVIGNON
<b>Société d'appartenance (facultatif)</b>		
<b>3</b>	<b>Nom</b>	MICHEL
	<b>Prénoms</b>	Nicolas
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	14, rue Ledru-Rollin
	<b>Code postal et ville</b>	840001 AVIGNON
<b>Société d'appartenance (facultatif)</b>		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b> <b>OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)		
ORES Béatrice 92-4046		Paris, le 23 octobre 2003 

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

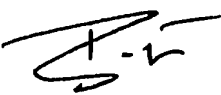
**DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S)** Page N° 2../2..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

**INV**

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 0 W / 270601

<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b>		VCstsF1578/3FR
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		0312390
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)		
NOUVEAUX TENSIO-ACTIFS ET LEURS APPLICATIONS		
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b>		
TS PHARMA		
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b>		
<b>1</b>	Nom	FABIANO
	Prénoms	Anne-Sylvie
Adresse	Rue	Allée de la pause
	Code postal et ville	8142110 ALTHEN LES PALUDS
Société d'appartenance (facultatif)		
<b>2</b>	Nom	CONTINO-PEPIN
	Prénoms	Christine
Adresse	Rue	10, Lot. La Garance
	Code postal et ville	8142110 ALTHEN LES PALUDS
Société d'appartenance (facultatif)		
<b>3</b>	Nom	SALLES
	Prénoms	Jean-Pierre
Adresse	Rue	830 Chemin de Vergon,
	Code postal et ville	1135110 EGUILLES
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b> <b>OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)		
ORES Béatrice 92-4046		Paris, le 23 octobre 2003 

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**